

**Bioaccumulation du sélénium
et effets biologiques induits
chez le bivalve filtreur *Corbicula
fluminea*.**

Prise en compte de l'activité ventilatoire,
de la spéciation du sélénium
et de la voie de contamination.

Elodie FOURNIER

Octobre 2005

IRSN-2005/58 - FR

Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie

IRSN - Siège social - 77, av. du Général-de-Gaulle - 92140 Clamart
Standard +33 (0)1 58 35 88 88 - RCS Nanterre B 440 546 018

Thèse

Présentée à

L'université Bordeaux 1

Ecole Doctorale

**Sciences du Vivant, Géosciences et
Sciences de l'Environnement**

Par

Elodie Fournier

Pour l'obtention du titre de

Docteur Mention Sciences

Spécialité

Ecotoxicologie

**Bioaccumulation du sélénium
et effets biologiques induits
chez le bivalve filtreur *Corbicula fluminea*.**

Prise en compte de l'activité ventilatoire,
de la spéciation du sélénium
et de la voie de contamination.

Thèse soutenue le 10 octobre 2005

Après avis de :

Mr Campbell P., Professeur, INRS-ETE, Université du Québec

Rapporteur

Mr Fisher N., Professeur, Université de New-York

Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Mlle Adam C., Chercheur, IRSN Cadarache, encadrante IRSN

Mr Bourdineaud J.P., Professeur, LEESA, Université de Bordeaux 1,

Président

Mr Campbell P., Professeur, INRS-ETE, Université du Québec

Mr Fisher N., Professeur, Université de New-York

Mme Garnier-Laplace J., HDR, IRSN Cadarache, Directrice de thèse

Mr Massabuau J.C., Directeur de recherche, CNRS 5805, Co-directeur de thèse

Mme Potin-Gautier M., Professeur, Université de Pau

Remerciements

Je tiens à adresser mes très sincères remerciements à tous les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail et à l'ensemble des personnes qui ont contribué à l'élaboration de cette thèse.

Tout d'abord, je souhaiterais remercier Mme Jacqueline Garnier-Laplace et Mr Jean-Christophe Gariel de m'avoir accueillie au sein de leur équipe et de m'avoir confié ce sujet de thèse. Un merci particulier à Jacqueline, en tant que directrice de thèse, pour la confiance qu'elle a su me porter et la disponibilité dont elle a fait preuve tout au long de cette thèse. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Jean-Charles Massabuau pour avoir co-dirigé avec grand intérêt ce travail. Malgré la distance, Jean-Charles a toujours su me conseiller et apporter ses enseignements avisés sur la partie physiologie du bivalve. Je tiens également à adresser ma gratitude à Christelle Adam pour son encadrement en temps que tuteur IRSN et l'aide précieuse qu'elle m'a apportée lors de la rédaction de ce manuscrit. Merci à Christelle pour sa bonne humeur permanente, son immense gentillesse, ses encouragements et sa confiance.

Je suis très sensible à l'honneur que m'ont fait Mrs les Professeurs Campbell et Fisher, en acceptant d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je tiens également à remercier Mr le Professeur Bourdineaud qui a gentiment accepté d'être membre du jury.

Je ne saurais oublier de saluer, dans ces remerciements, Monsieur Damien Tran, qui est le premier à m'avoir initiée à l'écophysiologie et l'écotoxicologie chez le bivalve, en maîtrise, puis en DEA. Damien a su me donner le goût de la recherche, l'envie et la motivation nécessaire pour poursuivre dans cette voie. Je tiens également à remercier tous les membres du LEESA, où le séjour est toujours rendu agréable. Après m'avoir accueillie en maîtrise, puis en DEA, ils ont contribué à la réalisation des analyses d'expressions génétiques au cours de cette thèse.

Je remercie enfin tous les membres du laboratoire qui ont participé, de près ou de loin, au bon déroulement de ce doctorat. Merci plus particulièrement à :

- *Marcel Morello, pour les nombreux et rapides dosages en scintillation liquide qu'il a effectués pour moi.*
- *Virginie Camilleri, avec qui il est très agréable et appréciable de travailler. Je la remercie pour l'efficacité et l'implication dont elle a fait preuve lors de mes dernières expérimentations.*
- *Isabelle Cavalié pour m'avoir enseigné l'art et la manière de dompter le FIAS, appareil de mesure du sélénium.*
- *Magali Floriani, et son jouet, le MET, pour les heures qu'elle a passées à inclure, couper, recouper, observer, analyser, sonder, photographier,... Je la remercie d'une part pour sa rigueur et son implication dans le travail, mais aussi pour son amitié, écoute et soutien tout au long de cette thèse.*
- *Brigitte Ksas pour tous ses petits services rendus facilitant la vie au laboratoire : gestion des déchets, des corbis, des commandes,...*
- *Olivier Simon, pour sa promptitude à l'effort de pêche.*
- *Hervé Spor, pour sa disponibilité, pluri et multi fonctionnalité, diplomatie, patience et sa confiture aux abricots.*
- *Sabrina Barillet, ma voisine de bureau, pour tous ses enseignements et dépannages informatiques.*
- *Hélène Morlon, pour m'avoir initiée à la culture algale, mais aussi au monde des grimpeurs et plongeurs.*
- *Christophe et Thomas, pour leurs blagues orientées et douteuses, qui finissent toujours par faire rire.*
- *Claudine, pour sa gentillesse, disponibilité et ses carambars à la fraise.*
- *Super Roro, pour sa Grande Gentillesse (parfois trop grande !).*
- *... et tous les autres.*

Enfin, merci à tous mes proches de m'avoir toujours soutenue et encouragée.

Liste des abréviations

- AE** : Assimilation Efficiency (Efficacité d'Assimilation)
- AFSSA** : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
- ANDRA** : Agence Nationale de la gestion des Déchets Radioactifs
- BCF** : BioConcentration Factor (Facteur de BioConcentration)
- CAT** : Catalase
- CE** : Coefficient d'Extraction
- coxI*: Gène de la cytochrome c oxydase 1
- Cyst** : Cystéine
- DPM** : Désintégration Par Minute
- EC** : Effect Concentration (Concentration d'Effet)
- EPA** : Environmental Protection Agency
- ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène
- FC** : Facteur de Concentration
- GPx** : Glutathion Peroxydase
- GSH** : Glutathion réduit
- GSSG** : Glutathion oxydé
- HG-QFAAS** : Hydride Generation - Quartz Furnace Atomic Absorption Spectrometry
- HSM** : High Salt Medium (milieu de culture des algues)
- ICP-AES** : Spectrométrie d'Emission Atomique – Source Plasma à Couplage Inductif
- LC** : Lethal Concentration (Concentration Létale)
- MET** : Microscope Electronique à Transmission
- mtI*: Gène de la métallothionéine 1
- NOEC** : No Observed Effect Concentration (concentration sans effet observé)
- rpS9*: Gène de la protéine ribosomique S9
- SeCyst** : Sélénocystéine
- SeMet** : Sélénométhionine
- SOD** : Superoxyde dismutase

S9 : Fraction obtenue après centrifugation à 9000 *g* pendant 30 minutes

RDA : Recommended Dietary Allowance

T_b : Période biologique

TCA : Acide TrichloroAcétique

tit : Gène de la titine

\dot{V}_w : Débit ventilatoire

Table des matières

1. BASES BIBLIOGRAPHIQUES.....	7
1.1. Le contaminant étudié : le sélénium.....	7
1.1.1. Propriétés générales.....	7
1.1.2. Sources et concentrations de Se dans l'environnement.....	11
1.1.3. Cycle biogéochimique du sélénium.....	13
1.1.4. Métabolisme du sélénium chez les animaux.....	15
1.1.5. Bioaccumulation du sélénium chez les organismes aquatiques.....	17
1.1.6. Rôle physiologique et toxicité du sélénium.....	27
1.2. Le modèle biologique étudié : <i>Corbicula fluminea</i>	39
1.2.1. Origine.....	39
1.2.2. Intérêt écotoxicologique : espèce bioindicatrice.....	39
1.2.3. Ecologie.....	39
1.2.4. Anatomie et physiologie.....	41
1.2.5. Branchies et mécanique ventilatoire.....	43
1.2.6. Facteurs du milieu influençant la physiologie respiratoire de <i>C. fluminea</i>	47
2. DEMARCHE EXPERIMENTALE ET PRINCIPAUX PARAMETRES ETUDIES	51
2.1.1. Démarche expérimentale.....	51
2.1.2. Paramètres étudiés.....	55
2.1.3. Articulation du mémoire.....	65
3. MATERIELS ET METHODES	69
3.1. Conditions expérimentales	69
3.1.1. Origine et maintenance des organismes.....	69
3.1.2. Choix du milieu d'exposition.....	69
3.1.3. Dispositif expérimental.....	69
3.1.4. Voies de contamination.....	71
3.2. Mesure du débit ventilatoire	73
3.3. Méthodes d'analyses du sélénium.....	75

3.3.1.	Dosage du sélénium stable	75
3.3.2.	Dosage du ⁷⁵ Se	79
3.4.	Dosages biochimiques	81
3.4.1.	Protocoles de préparations des fractions S9 pour le dosage des biomarqueurs	81
3.4.2.	Protocole de dosage des activités enzymatiques	83
3.5.	Expression de gènes.....	87
3.6.	Le Microscope Electronique à Transmission (MET) et la spectrométrie par dispersion d'énergie (EDS).....	89
3.6.1.	Appareillage	89
3.6.2.	Préparation des échantillons	89
3.7.	Fractionnement subcellulaire et chromatographie basse pression	91
3.7.1.	Préparation des fractions subcellulaires	91
3.7.2.	La chromatographie d'exclusion stérique	93
3.8.	Bases théoriques de la modélisation des transferts du sélénium	97
3.9.	Analyses statistiques des résultats	101
4.	RESULTATS ET DISCUSSION	103
4.1.	Bioaccumulation du sélénium chez <i>C. fluminea</i> : rôle de la ventilation du bivalve et de la spéciation du sélénium	103
4.1.1.	Bioaccumulation du sélénium par la voie directe : effet de la ventilation du bivalve et de la spéciation du sélénium.....	105
4.1.2.	Bioaccumulation du sélénium par la voie trophique : effet de la ventilation du bivalve et de la spéciation du sélénium.....	123
4.1.3.	Comparaison de la bioaccumulation du sélénium par la voie directe et par la voie trophique.....	147
4.1.4.	Principales avancées et conclusions du chapitre	165

4.2. Bioaccumulation du sélénium à différents niveaux	
d'organisation biologique chez <i>C. fluminea</i>	167
4.2.1. Introduction	167
4.2.2. Résultats	171
4.2.3. Discussion.....	179
4.2.4. Principales avancées et conclusions	189
4.3. Toxicité subcellulaire du sélénium.....	193
4.3.1. Suivi du statut anti-oxydant de <i>C. fluminea</i> lors d'une exposition au Se....	
.....	193
4.3.2. Effet du sélénium sur l'expression de gènes	207
4.3.3. Effet d'une exposition au Se sur l'ultrastructure des cellules branchiales	
de <i>C. fluminea</i>	213
4.3.4. Principales avancées et conclusions du chapitre	225
5. CONCLUSION GENERALE	227
5.1. Synthèse des principales avancées	227
5.1.1. Avancées concernant l'écophysiologie du bivalve.....	227
5.1.2. Avancées concernant la bioaccumulation du sélénium.....	231
5.1.3. Avancées concernant la toxicité du sélénium.....	235
5.2. Perspectives de recherches	237
5.2.1. Concernant l'écophysiologie de <i>C. fluminea</i>	237
5.2.2. Concernant la bioaccumulation	239
5.2.3. Concernant la toxicité.....	241

Introduction générale

Le développement de l'industrialisation a conduit à des contaminations de plus en plus importantes de l'ensemble des écosystèmes. Une fois présents dans l'environnement, les polluants subissent de nombreux phénomènes de transport, par l'air, ou par l'eau et aboutissent généralement dans le domaine aquatique. La contamination des milieux aquatiques devient donc un problème fondamental car elle peut constituer un risque pour la biocénose et la préservation des ressources. L'une des priorités de la Directive Cadre européenne sur l'eau (2000/60/CE) du 23/10/2000 est la protection de tous les milieux aquatiques naturels avec un objectif de « bon état écologique » pour les eaux de surface à l'horizon 2015. Parmi les substances classées comme toxiques, le sélénium est un élément pour lequel la concentration maximale admissible pour les eaux de surface, $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, est régulièrement dépassée. Des anomalies en sélénium ont ainsi été relevées dans les eaux de captage ou de redistribution dans de nombreux départements français (AFSSA, 1999; AFSSA, 2004). Le dépassement des concentrations en Se peut provenir des nombreuses utilisations du sélénium par l'homme (médecine, agriculture, industrie) qui font qu'il va pouvoir être relargué dans l'environnement, par les eaux usées, l'irrigation de zones agricoles naturellement riches en Se ou encore la production et la combustion du charbon (Barceloux, 1999; Lemly, 2004). Dans le domaine du cycle du combustible nucléaire, son isotope radioactif, le ^{79}Se , fait partie de la liste des radionucléides à vie longue et est présenté comme élément prioritaire au sens de l'évaluation de la sûreté selon la méthodologie développée par l'ANDRA (Agence Nationale de la gestion des Déchets Radioactifs) (ANDRA, 2001). Dans ce cadre général, l'étude des processus d'accumulation et de toxicité du sélénium dans les écosystèmes aquatiques continentaux est primordiale.

Le sélénium est un élément essentiel chez les organismes vivants dans une gamme étroite de concentrations (Hodson et Hilton, 1983; EPA, 2004). La toxicité du sélénium dans l'environnement s'est déjà manifestée à plusieurs reprises, notamment par des effets sur la reproduction ou une mortalité accrue chez des populations de poissons et d'oiseaux aquatiques (Lemly, 2002a; Ohlendorf, 2002; Hamilton, 2004; Lemly, 2004). Cependant, la compréhension de l'impact de cette pollution est limitée par la complexité de nombreux états d'oxydation du sélénium, qui vont gouverner son cycle biogéochimique et sa toxicité. Dans le milieu aquatique en conditions oxydantes à modérément oxydantes, il a tendance à former des oxyanions, sélénite $\text{Se}(+\text{IV})$ et séléniate $\text{Se}(+\text{VI})$ (Coughtrey *et al.*, 1983), qui sont très mobiles et donc potentiellement biodisponibles pour les organismes.

Lors de son transfert dans les réseaux trophiques, il pourra être converti en différentes formes organiques et inorganiques. Peu d'études ont été menées concernant les effets liés à ces différents états redox sur les organismes de niveau trophique supérieur. De plus, pour un même modèle biologique, la bioaccumulation est rarement appréhendée par les 2 voies de contamination (directe-trophique). La majorité des études en laboratoire prenant en compte la spéciation du sélénium, ont été réalisées sur des modèles unicellulaires phytoplanctoniques ou bactériens (Kiffney et Knight, 1990; Riedel *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1996; Riedel et Sanders, 1996; Riedel *et al.*, 1996; Morlon, 2005). C'est pour ces raisons, que nous avons choisi d'étudier un modèle biologique consommateur primaire, appartenant à la classe des bivalves. Parmi ces animaux, diverses espèces vivent à l'interface eau/sédiment et sont très utilisées en écotoxicologie en tant que bioindicateurs de contamination.

Ils peuplent de nombreux systèmes aquatiques où les caractéristiques du milieu peuvent être très variables. Leur activité ventilatoire sert deux fonctions primordiales : respiration et nutrition. Ainsi, leurs branchies sont à la fois une voie de passage pour des contaminations directes et trophiques. Le bivalve *Corbicula fluminea* a été choisi car de nombreux aspects de sa physiologie respiratoire ont déjà été largement étudiés (Tran, 2001). Récemment, il a été montré que chez cet organisme, deux facteurs vont pouvoir conditionner l'entrée de polluants : la spéciation chimique du contaminant considéré et l'intensité de l'activité ventilatoire du bivalve (Tran *et al.*, 2004b).

Ainsi, pour comprendre les processus impliqués dans l'accumulation du sélénium et sa toxicité chez *C. fluminea*, les facteurs qui ont été pris en compte sont la spéciation chimique du sélénium, la dépendance de l'activité ventilatoire du bivalve vis à vis des conditions environnementales et la voie de contamination. Notre démarche expérimentale a consisté tout d'abord à étudier l'impact de différentes formes chimiques de Se et de différentes intensités ventilatoires du bivalve, obtenues en modifiant les apports trophiques, sur la bioaccumulation après une exposition de trois jours par la voie directe et par la voie alimentaire. L'impact du sélénium lui-même sur la ventilation a été évalué.

Dans un deuxième temps, afin d'apprécier plus finement les processus d'accumulation du sélénium chez *C. fluminea* par la voie directe, des cinétiques d'accumulation et de dépuración de différentes formes chimiques de Se ont été réalisées sur 70 jours. La distribution tissulaire du sélénium a également été caractérisée à différents niveaux d'organisation biologique, tissulaire et subcellulaire.

Pour finir, les effets potentiellement toxiques du sélénium ont été appréhendés aux niveaux cellulaire et moléculaire. Ainsi, l'effet de différentes formes chimiques de Se sur la morphologie du tissu branchial, le statut antioxydant du bivalve et l'expression génétique de certaines protéines a été analysé.

Ce mémoire s'articule en 5 parties. La première partie est une synthèse bibliographique, rassemblant des données concernant d'une part le sélénium, ses propriétés chimiques et biologiques, sa présence dans les écosystèmes aquatiques ainsi que sa bioaccumulation et ses impacts chez les organismes, et d'autre part, le bivalve, son écologie, son anatomie et sa physiologie respiratoire. Dans la seconde partie, la démarche expérimentale et les principaux paramètres étudiés sont exposés. La troisième partie présente les principaux matériels et méthodes utilisés. Dans la quatrième partie, sont exposés et discutés l'ensemble des résultats expérimentaux. Enfin, la cinquième partie établit une synthèse et la conclusion du travail effectué en ouvrant sur de nouvelles perspectives.

Tableau 1 : Principales formes chimiques des composés naturels séléniés.

Formes	Nom	Etat de valence	Formes chimiques
<i>Inorganiques</i>	Séléniate	Se(+VI)	H_2SeO_4 ; $HSeO_4^-$; SeO_4^{2-}
	Sélénite	Se(+IV)	H_2SeO_3 ; $HSeO_3^-$; SeO_3^{2-}
	Sélénium élémentaire	Se(0)	
	Séléniure	Se(-II)	H_2Se ; HSe^- ; Se^{2-}
<i>Organiques</i>	Sélénocystéine		Se- CH_2CHNH_2COOH
	Sélénométhionine		$CH_3CH_2Se(CH_2)_2CHNH_2COOH$
	Diméthylséléniure		$(CH_3)_2Se$
	Diméthyldiséléniure	Se(-II)	$(CH_3)_2Se_2$
	Diméthylsélénone		$(CH_3)_2SeO_2$
	Se-méthylsélénocystéine		MeSe CH_2CHNH_2COOH
	Se-méthylsélénométhionine		$(CH_3)_2Se(CH_2)_2CHNH_2COOH$

1. BASES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. Le contaminant étudié : le sélénium

1.1.1. Propriétés générales

1.1.1.1. Propriétés chimiques

Le sélénium (symbole Se, numéro atomique 34) est un métalloïde qui appartient au groupe VI (oxygène, soufre, polonium, tellurium) du tableau périodique. Il ressemble étroitement au soufre (S) par ses propriétés chimiques telles que taille atomique, énergies de liaison, potentiels d'ionisation et principaux degrés d'oxydation (Tinggi, 2003; Johansson *et al.*, 2005).

Dans l'organisme, le sélénium est présent sous forme de séléniol (R-SeH) ou de sélénoéther (R-Se-R). Il peut également se combiner au soufre (R-S-Se-H ou R-S-Se-S-R) ou s'y substituer pour former de nombreux composés analogues séléniés : sélénométhionine (SeMet) et sélénocystéine (SeCyst) (Ducros et Favier, 2004). Des différences existent dans la chimie du soufre et du sélénium, notamment entre les potentiels d'oxydoréduction ou d'ionisation des composés homologues. Par exemple, les composés séléniés ont tendance à être beaucoup plus nucléophiles que les composés soufrés (Arteel et Sies, 2001). Le séléniure d'hydrogène ($pK_a = 3.7$ pour le couple H_2Se/HSe^- ; $pK_a = 5.7$ pour le couple HSe^-/Se^{2-}) est un acide plus fort que le sulfure d'hydrogène ($pK_a = 6.9$ pour le couple H_2S/HS^- ; $pK_a = 8.5$ pour le couple HS^-/S^{2-}) (Johansson *et al.*, 2005). Ainsi, le sélénium sous forme de séléniol (R-SeH) est aisément dissocié aux pHs physiologiques, ce qui est important pour son rôle catalytique (Tinggi, 2003). La cystéine (Cyst) est le plus souvent sous forme protonée aux pHs physiologiques alors que la SeCyst est principalement sous forme anionique ($pK_a = 5.2$ pour la SeCyst et $pK_a = 8.3$ pour la Cyst), ce qui facilite le rôle catalytique du sélénium dans les sélénoprotéines (Ducros et Favier, 2004; Johansson *et al.*, 2005) .

Les différentes formes chimiques des composés séléniés naturels sont présentées dans le Tableau 1. Il existe plusieurs composés séléniés dans les tissus de plantes et d'animaux (Whanger, 2002). La SeCyst (acide aminé sélénié) est la forme prédominante dans les tissus animaux lorsque du sélénite leur est administré (Hawkes *et al.*, 1985; Schrauzer, 2000; Whanger, 2002).

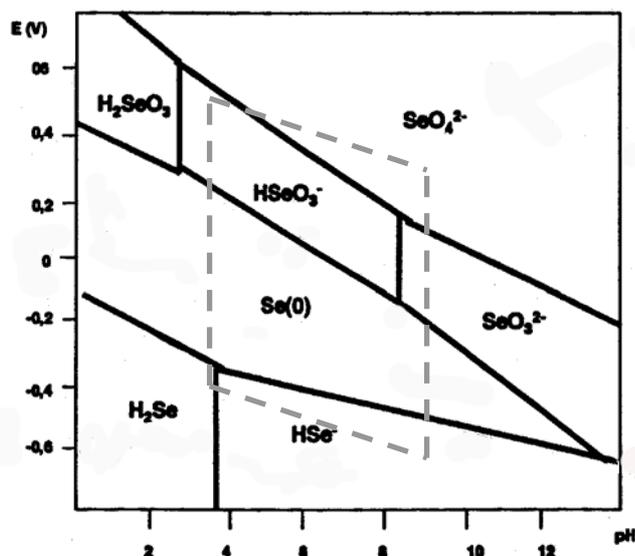


Figure 1 : Etats d'oxydation du sélénium en solution (d'après Séby *et al.*, 2001), à 25 °C, 1000 hPa (pression atmosphérique) et $[Se] = 0.1 \mu M$. La zone délimitée en gris représente la zone d'oxydo-réduction susceptible d'être rencontrée dans l'environnement.

Tableau 2 : Les isotopes du sélénium (Nuclide 2000, 1999).

Masse atomique relative ($g \cdot mol^{-1}$)	78.96
Nombre d'isotopes :	25
Nombre d'isotopes stables :	5
Nombre d'isotopes quasi stables :	1
Nombre d'isotopes émetteurs β^+ :	9
Nombre d'isotopes émetteurs β^- :	10

Si l'on donne de la SeMet aux animaux, la SeMet sera le composé majeur trouvé initialement mais il sera rapidement converti en SeCyst (Whanger, 2002). Les céréales et les plantes fourragères convertissent le sélénium inorganique principalement en SeMet (Schrauzer, 2000). La SeMet est la forme majoritaire dans les graines de céréales et levures (Whanger, 2002). Chez *Saccharomyces cerevisiae* 90 % du sélénium est sous forme de SeMet (Schrauzer, 2000). D'une manière générale, la SeMet est rapportée comme étant la forme prédominante dans les tissus de plantes et d'algues (Guo et Wu, 1998; Tinggi, 2003).

Dans les écosystèmes aquatiques, le sélénium existe sous quatre états de valence : séléniat (+VI) ; sélénite (+IV) ; sélénium élémentaire (0) et séléniure (-II). Le séléniat (+VI) et le sélénite (+IV) sont les formes les plus communes des eaux de surface en conditions oxydantes à modérément oxydantes (Coughtrey *et al.*, 1983). La stabilité des différents états redox est fonction du potentiel électrochimique du milieu (Séby *et al.*, 2001) (Figure 1). Dans la nature, le sélénium sous forme Se(-II) peut être associé à des métaux tels que HgSe, PbSe, CdSe, CuSe (EPA, 2004). Un certain nombre de données concernant la spéciation du sélénium dans les eaux continentales et marines a été rapporté dans la littérature (Robberecht et Grieken, 1982; Conde et Sanz Alaejos, 1997; Cutter et Cutter, 2004). D'une manière générale, les formes majoritaires sont sélénite et séléniat. Il y a assez peu de données sur les composés organiques séléniés. Ils sont généralement minoritaires (Robberecht et Grieken, 1982). Cependant, dans une étude récente (Cutter et Cutter, 2004), il a été montré que dans la baie de Sacramento, les séléniures organiques représentaient 40 % du sélénium total, tandis que le sélénite en représentait 13 % et le séléniat 47 %. L'étude de la distribution du sélénium dans 11 eaux de surface différentes, indique qu'en moyenne, 16 % du sélénium total est fixé sur la phase particulaire (EPA, 2004).

1.1.1.2. Propriétés nucléaires

Le sélénium possède 6 isotopes stables ou quasi-stables (Tableau 2). Sa masse atomique relative est de $78.96 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Il possède également plusieurs isotopes radioactifs, qui sont exclusivement artificiels. Le ^{79}Se est un produit de fission nucléaire (émetteur β^- , demi-vie : $1.1\cdot 10^6$ ans). Il s'agit d'un radionucléide à vie longue, qui est classé comme élément prioritaire pour l'évaluation des risques associés aux sites de stockage des déchets selon la méthodologie développée par l'ANDRA pour son référentiel biosphère de 2001 (ANDRA, 2001). Le ^{75}Se (émetteur β^+ / γ , demi-vie : 120 jours) est utilisé en radiologie et pour les traçages.

1.1.1.3. Propriétés biochimiques générales

Le sélénium est un élément trace essentiel pour les humains et pour une grande variété d'espèces animales (Tinggi, 2003). Il est essentiel pour le fonctionnement d'enzymes anti-oxydantes, notamment la glutathion peroxydase (GPx) qui contient de la SeCyst dans son site actif. Il existe également de nombreuses autres sélénoprotéines (la sélénoprotéine P ou encore la thioredoxine réductase) qui ont besoin de Se pour leur activité catalytique (Himeno et Imura, 2000; Ducros et Favier, 2004). Il a également été montré qu'il pouvait constituer un agent préventif du cancer (Tapiero *et al.*, 2003) et de maladies inflammatoires (Ducros et Favier, 2004).

La frontière entre concentrations en sélénium physiologiquement essentielles et toxiques est très étroite. La dose minimale requise par jour chez l'homme est de $55 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (RDA : *Recommended Dietary Allowance*) et la dose maximale acceptable est de $350 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (UL : *tolerable Upper intake Level*) (Goldhaber, 2003). La déficience en Se chez l'Homme est responsable de la maladie de Keshan (Bokovay, 1995). Les symptômes d'une intoxication au sélénium peuvent être l'apparition de troubles digestifs (diarrhées), de signes neurologiques (convulsions, coma), des irritations cutanées, des troubles respiratoires et une odeur alliacée de l'haleine (INRS, 2002).

1.1.2. Sources et concentrations de Se dans l'environnement

Le sélénium est naturellement présent dans l'écorce terrestre à une concentration d'environ $0.05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Coughtrey *et al.*, 1983). Deux inventaires des concentrations pouvant être retrouvées dans le milieu aquatique sont disponibles dans la littérature (Robberecht et Grieken, 1982; Conde et Sanz Alaejos, 1997). Les concentrations en Se dans les eaux de surface, marines et continentales, sont rarement supérieures au $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en milieu non contaminé (allant du $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ au $1/10$ de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Sa large utilisation par l'homme peut induire une augmentation de ces niveaux, jusqu'à des concentrations pouvant atteindre plusieurs centaines de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

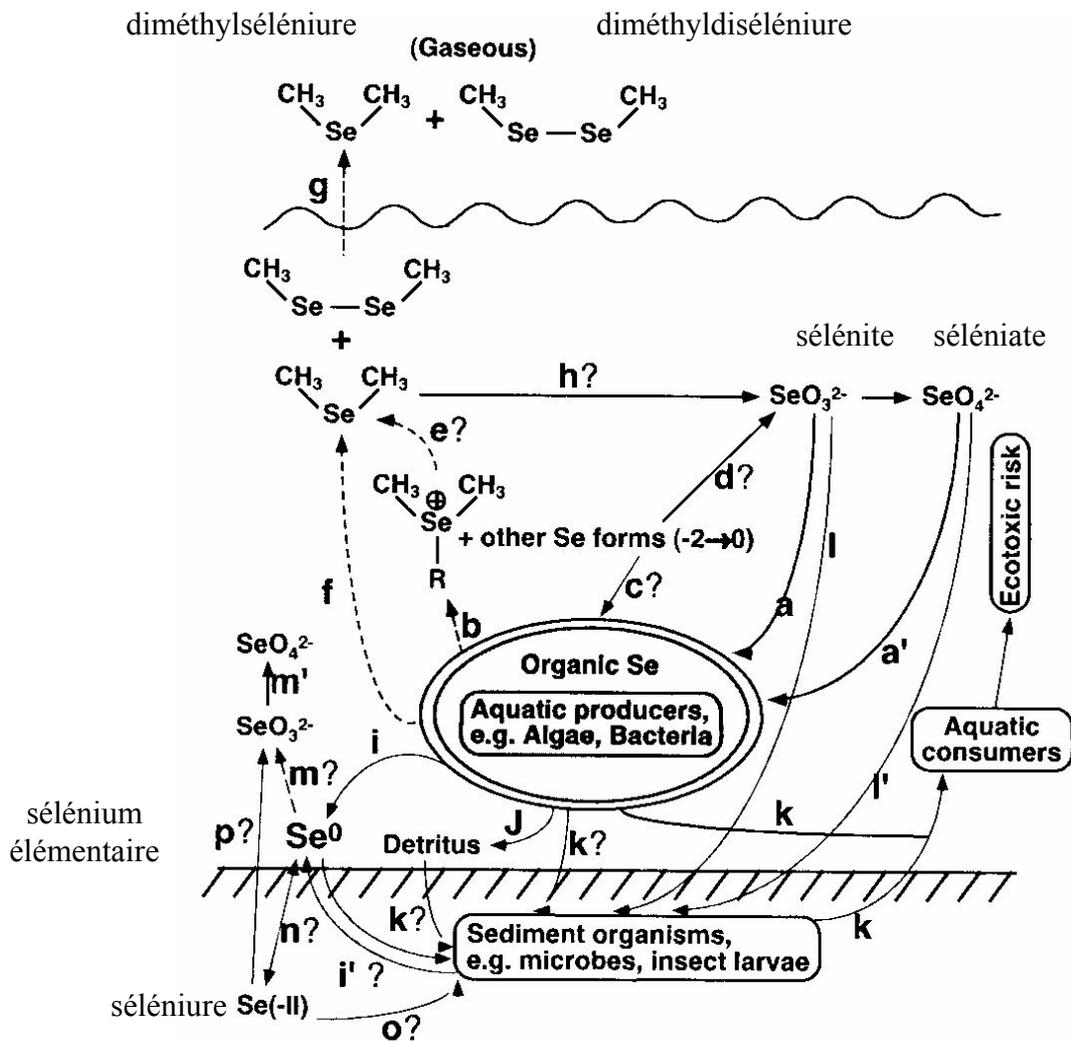


Figure 2 : Cycle biogéochimique du sélénium dans les écosystèmes aquatiques (d'après Fan *et al.*, 2002).

Les flèches pleines indiquent les processus qui peuvent mener à des risques écotoxicologiques tandis que les flèches en pointillé indiquent les processus de volatilisation du sélénium à l'origine d'une perte nette de sélénium de la part du système aquatique. Les flèches avec des points d'interrogation représentent des processus supposés. (a, a') prise en charge et transformation des espèces inorganiques par les producteurs primaires aquatiques (b) relargage de composés organiques par les producteurs primaires aquatiques (c) prise en charge de composés organiques par les producteurs primaires aquatiques (d) oxydation abiotique de composés organiques en oxyanions (e) relargage d'alkyséléniures par réaction abiotique (f) relargage d'alkyséléniures par les producteurs primaires aquatiques (g) volatilisation des alkyséléniures dans l'atmosphère (h) oxydation des alkyséléniures en formes inorganiques (i) formation de sélénium élémentaire par les organismes pélagiques et benthiques (j) formation de détritus par les producteurs aquatiques (k) bioaccumulation dans la chaîne trophique et conséquences potentielles en termes d'écotoxicité (l, l') assimilation des oxyanions de sélénium aux sédiments depuis la colonne d'eau (m, m') oxydation du sélénium élémentaire en oxyanions de sélénium (n) réactions redox entre $Se(0)$ et $Se(-II)$ (o) assimilation de $Se(-II)$ depuis le sédiment vers les organismes benthiques (p) oxydation de $Se(-II)$ du sédiment en sélénite.

Il est largement utilisé par l'Homme à des fins industrielles et médicales. La production mondiale de sélénium est de 1900 tonnes par an (Bokovay, 1995). Les usages industriels de ce métalloïde et de ses composés peuvent être divisés en diverses catégories : applications électriques/électroniques (30 %), fabrication de pigments (19 %), industrie de verre (20 %), métallurgie (14 %), applications agricoles et biologiques (6 %), autres usages comme vulcanisation de caoutchouc ou oxydation de catalyseurs (11 %) (Bokovay, 1995). Dans le domaine médical, le sélénium est utilisé comme complément alimentaire, mais aussi dans le traitement des pellicules, de la dermatite séborrhéique et d'autres maladies de la peau (George, 2003). Ainsi, un certain nombre d'activités anthropiques conduisent aux rejets de Se dans l'environnement : production et combustion du charbon, exploitation de mines de Cu, Zn, Ni, Ag ; décharges municipales ; eaux usées ; fertilisation et irrigation à des fins agricoles ; processus industriels (Barceloux, 1999; Lemly, 2004).

Dans le milieu aquatique, les sources de sélénium dans l'eau viennent des dépôts sec et humide, de l'atmosphère, et du drainage de la surface. Certains sites contaminés sont relativement bien documentés. C'est le cas de la réserve de Kesterson (Californie, US) où l'agriculture est intensive (Barceloux, 1999). Les eaux d'irrigation sont drainées dans des sols avec de fortes concentrations en sélénium. Suite à d'importantes pluies, on peut noter des concentrations en Se allant jusqu'à $162 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ au niveau de certaines étendues d'eau (Ohlendorf, 2002). Un autre site pollué très documenté est le lac Belews (Caroline du Nord, US), qui a été contaminé par des eaux usées provenant d'une centrale électrique à charbon (Barceloux, 1999). Des eaux usées chargées en Se ($150\text{-}200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ont été relarguées de 1974 à 1986. La concentration moyenne dans ce lac est de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Lemly, 1999).

1.1.3. Cycle biogéochimique du sélénium

Le cycle du sélénium est étroitement lié aux premiers niveaux de la chaîne trophique (décomposeurs et producteurs primaires), qui représentent une biomasse importante dans les écosystèmes. Ils conditionnent les cinétiques de bioaccumulation et de biotransformation vis à vis des maillons trophiques supérieurs. Les principales connaissances concernant le cycle biogéochimique du sélénium sont résumées dans la Figure 2.

- Se(+IV) et Se(+VI) sous forme d'oxyanions dissous sont accumulés par les producteurs primaires et biotransformés en formes organiques Se(-II) (Vandermeulen et Foda, 1988; Fan *et al.*, 2002; Simmons et Wallschläger, 2005).
- Le sélénium ainsi pris en charge par les producteurs primaires est ensuite transféré aux maillons trophiques supérieurs (Zhang *et al.*, 1990; Fan *et al.*, 2002).
- Les producteurs primaires volatilisent du sélénium (séléniures méthylés, Se(-II)) qui peut être évacué vers l'atmosphère ou retransformé en sélénite.
- Les producteurs primaires peuvent aussi relarguer des composés organiques Se(-II) ou du Se(0), formés par réduction biologique (Hu *et al.*, 1996).
- Ce Se(0) peut être réduit en séléniures inorganiques ou organiques et réoxydé en sélénite ou séléniate, par les microorganismes du sédiment (Fan *et al.*, 2002). La prise en charge de Se(0) par un consommateur (le bivalve) a également été rapportée dans la littérature (Luoma *et al.*, 1992).
- Parmi les phénomènes abiotiques, il y aurait des phénomènes d'oxydation et de réduction dans la colonne d'eau (Fan *et al.*, 2002) ainsi que des précipitations du sélénium avec les métaux pour donner des séléniures métalliques (EPA, 2004).

La bioaccumulation du sélénium par la voie trophique apparaît plus importante que la bioaccumulation par la voie directe (Zhang *et al.*, 1990; Besser *et al.*, 1993). Ainsi les phénomènes de biotransformations au niveau des premiers maillons de la chaîne alimentaire, vont conditionner les niveaux de bioaccumulation du sélénium chez les organismes de niveau trophique supérieur.

1.1.4. Métabolisme du sélénium chez les animaux

Le métabolisme du sélénium a été abordé par plusieurs auteurs (Ganther, 1999; Schrauzer, 2000; Whanger, 2002; Ducros et Favier, 2004). Le métabolisme du sélénium chez les mammifères a été clairement décrit par Ducros et Favier (2004) et indique que :

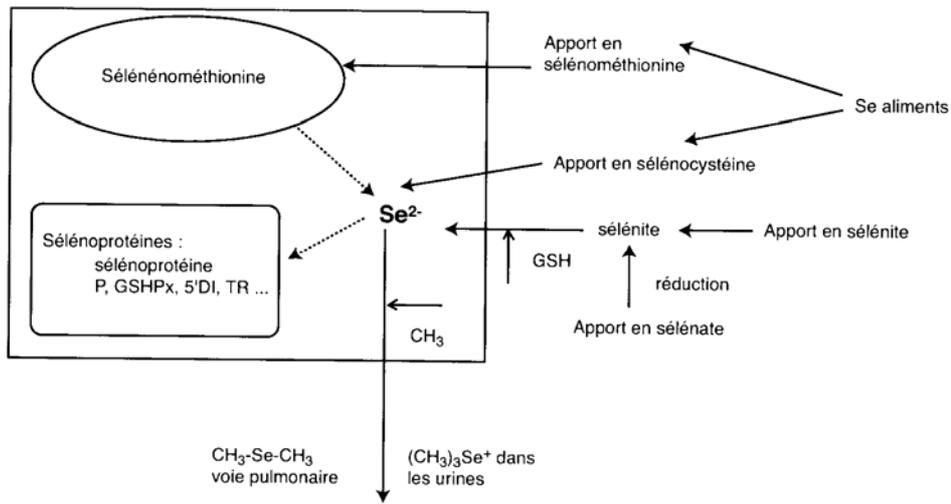


Figure 3 : Voies métaboliques des différentes formes d'apport en sélénium (d'après Ducros et Favier, 2004).

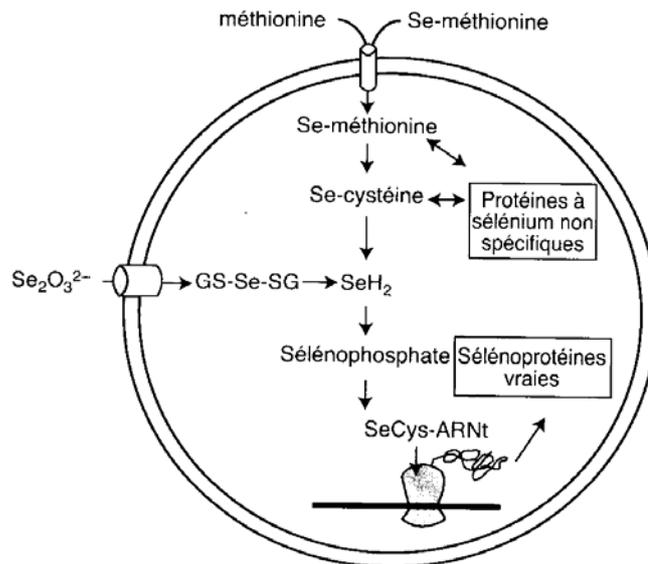


Figure 4 : Métabolisme cellulaire du sélénium (d'après Ducros et Favier, 2004).

L'absorption intestinale du sélénium est élevée (50-95%) et dépend de la forme d'apport du sélénium, ainsi que du statut physiologique vis à vis du sélénium. La SeMet est mieux absorbé que le sélénite et l'est par un transport actif analogue à celui de la méthionine. Le sélénite est absorbé par simple diffusion et le séléniat, presque aussi efficacement transporté que la SeMet, l'est par un transport actif commun avec celui des sulfates. L'ensemble des formes de sélénium organiques et inorganiques peut être utilisé par l'organisme mais leur métabolisme est différent.

Le métabolisme du sélénium dépend de la forme chimique ingérée (Figure 3). Le sélénite entre dans les cellules par transport anionique et est rapidement conjugué au glutathion sous forme de sélénodiglutathion (Ganther, 1999; Ducros et Favier, 2004). Les acides aminés séléniés utilisent les transporteurs membranaires destinés à leurs homologues soufrés et sont métabolisés en utilisant les voies métaboliques des enzymes soufrées. Le sélénium absorbé est réduit à l'état de séléniures (H_2Se) puis incorporé dans les protéines sous forme de SeCyst par l'intermédiaire d'un ARNt spécifique (Figure 4). La SeCyst est considérée comme le 21^e acide aminé. Elle est codée par un codon UGA qui est normalement considéré comme un codon stop. L'acide aminé est inclus dans les protéines par un mécanisme co-translationnel assez complexe. Une partie du sélénium va être utilisée pour produire des sélénoprotéines, qui sont des protéines qui vont avoir besoin du sélénium pour leur activité catalytique. Elles incorporent du sélénium sous forme de SeCyst dans la chaîne polypeptidique. D'autres formes de Se vont directement dans des protéines que l'on nomme « protéines contenant du sélénium », mais ces protéines n'ont pas besoin du sélénium pour leur activité catalytique, contrairement aux sélénoprotéines. Elles incorporent le sélénium par substitution de la méthionine par la SeMet.

L'excrétion du sélénium absorbé se fait sous forme de dérivés méthylés (méthylsélénol, diméthylséléniure et triméthylsélénonium) ou de sélénosucres excrétés dans les urines et/ou par les poumons.

1.1.5. Bioaccumulation du sélénium chez les organismes aquatiques

1.1.5.1. Processus de bioaccumulation et de prise en charge du sélénium

Rappels sur les processus de bioaccumulation

Chez les organismes aquatiques, et plus particulièrement les bivalves, les barrières biologiques à traverser, sont l'épithélium branchial, la paroi du tube digestif, et la coquille (qui est souvent rapportée comme un site de bioaccumulation). Les contaminants de la phase dissoute sont plus facilement absorbés par les surfaces directement en contact avec le milieu extérieur, tandis que les métaux/métalloïdes associés à la phase particulaire seront plutôt ingérés et internalisés après solubilisation dans le tube digestif, ou transférés par endocytose pour subir ensuite une digestion lysosomale. Une fois cette première barrière passée, les mécanismes de transfert des métaux/métalloïdes vers le milieu intracellulaire font appel à la diffusion (passive ou facilitée), au transport actif et à l'endocytose (phagocytose et pinocytose). La diffusion, qu'elle soit simple ou facilitée par la liaison avec un ligand, se fait dans le sens du gradient de concentration. Le transport actif est contraire au gradient de concentration, il nécessite donc de l'énergie.

Prise en charge

La prise en charge du sélénium a principalement été étudiée chez des modèles unicellulaires. Riedel *et al.* (1991) se sont intéressés à 3 espèces phytoplanctoniques (*Anabaenas flos aquae*, *Chlamydomonas reinhardtii*, et *Cyclotella meneghiniana*) et 3 formes chimiques de sélénium (sélénite, séléniate et SeMet). Ces auteurs suggèrent que le sélénite serait fixé par une sorption passive, tandis que séléniate et SeMet impliqueraient un processus biologique. Morlon (2005) montre au contraire l'existence d'un double système de transport du sélénite, de faible et de forte affinité, chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

Une inhibition du transport du sélénium par certains anions, et notamment du transport du séléniate par le sulfate est admise chez les organismes phytoplanctoniques (Williams *et al.*, 1994; Riedel et Sanders, 1996) ainsi que chez la daphnie (Ogle et Knight, 1996). Certains auteurs soulignent d'autres inhibitions de transport, telles que l'inhibition du transport du sélénite par le phosphate (Riedel et Sanders, 1996; Lee et Wang, 2001), par le sulfate (Morlon, 2005) et par le nitrate (Morlon, 2005).

L'influence des cations en solution a également été explorée. L'accumulation du séléniate chez *Chlamydomonas reinhardtii* augmente avec l'augmentation du calcium, magnésium et ammonium dans le milieu (Riedel et Sanders, 1996).

Tableau 3 : Facteurs de bioconcentration (BCF) du sélénium par la voie directe, exprimés sur la base du poids sec (p.s.) (non exhaustif).

Modèle biologique	Biotope	Forme chimique de Se	Temps d'exposition	BCF p.s.	Référence bibliographique
<i>Anabaena flos aquae</i> Cyanobactérie	dulçaquicole	sélénite	2-10 jours	BCF 267-1004	Kiffney et Knight, 1990
		séléniate	2-10 jours	BCF 30-115	
		SeMet	2-10 jours	BCF 1520-12193	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Algue verte unicellulaire	dulçaquicole	sélénite	1 jour	BCF 441-1600	Besser <i>et al.</i> , 1993
		séléniate	1 jour	BCF 414-493	
		SeMet	1 jour	BCF 5320-36300	
<i>Chlorella vulgaris</i> Algue verte unicellulaire	dulçaquicole	séléniate	12 – 24 jours	BCF 400	Dobbs <i>et al.</i> , 1996
<i>Daphnia magna</i> Daphnie	dulçaquicole	sélénite	4 jours	BCF 221-3650	Besser <i>et al.</i> , 1993
		séléniate	4 jours	BCF 65-293	
		SeMet	4 jours	BCF 30300-382000	
<i>Lysmata seticaudata</i> Crevette	marin	sélénite	6-52 jours	BCF 10 - 30	Fowler et Benayoun, 1976
<i>Mytilus edulis</i> Moule	marin	sélénite	10-63 jours	BCF 20 – 100	Fowler et Benayoun, 1976
<i>Lepomis macrochirus</i> Poisson	dulçaquicole	séléniate-sélénite 6 : 1	60 jours	BCF 5-7	Cleveland <i>et al.</i> , 1993

Dans le cas des animaux, un effet antagoniste du sélénium et du mercure a été montré chez deux espèces de poisson (Chen *et al.*, 2002). La concentration de Hg diminuait exponentiellement avec l'augmentation de concentration en sélénium dans le muscle.

Aucune étude sur les mécanismes de transport du sélénium n'a été réalisée chez le bivalve. Cependant, quelques études ont été menées sur les mécanismes de transport d'acides aminés tels que la méthionine ou d'anions tels que les sulfates, *in vitro*, sur des cellules branchiales de bivalves. Ainsi, il a été montré que l'absorption de la méthionine par les branchies du bivalve *Mya arenaria* était réalisée *via* un transport actif (Stewart, 1978). En ce qui concerne le transport du sulfate chez les bivalves, il a été montré chez la moule *Dreissena polymorpha* qu'il est relativement lent par rapport à celui des autres ions (Dietz et Byrne, 1999).

1.1.5.2. Bioaccumulation par la voie directe

La bioaccumulation dépend étroitement des formes de Se étudiées. Les principales valeurs de BCF trouvées dans la littérature sont rapportées dans le Tableau 3. Il a été montré chez plusieurs espèces végétales et animales (allant de l'algue unicellulaire au poisson) que la SeMet était la forme la plus bioaccumulée suivi du sélénite puis du séléniate (Kiffney et Knight, 1990; Riedel *et al.*, 1991; Besser *et al.*, 1993). Les valeurs des facteurs de bioconcentration (BCF¹), exprimés sur la base du poids sec sont cependant très variables. En ce qui concerne la SeMet, le BCF est de 1520-12193 pour la cyanobactérie *Anabaena flos aquae* (Kiffney et Knight, 1990), 5320-36300 pour l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Besser *et al.*, 1993) et 30300-382000 pour la daphnie *Daphnia magna* (Besser *et al.*, 1993). En ce qui concerne le sélénite, le BCF est de 267-1004 pour la cyanobactérie *Anabaena flos aquae* (Kiffney et Knight, 1990), 441 à 1600 pour l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Besser *et al.*, 1993) et 221-3650 pour la daphnie *Daphnia magna* (Besser *et al.*, 1993). Pour le séléniate, le BCF est de 30-115 pour la cyanobactérie *Anabaena flos aquae* (Kiffney et Knight, 1990), 414-493 pour l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Besser *et al.*, 1993) et 65-293 pour la daphnie *Daphnia magna* (Besser *et al.*, 1993).

En ce qui concerne les modèles bivalves, les niveaux de base en sélénium mesurés chez des populations vivant dans des milieux non contaminés ($< 1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) sont de l'ordre de $3.1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s. pour *Macoma balthica* et de $2.8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s. (soit environ $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.f.) pour *Corbicula sp.* (Johns *et al.*, 1988).

¹BCF : Le BCF est le rapport entre la concentration de Se accumulée dans l'organisme et la concentration de Se dans l'eau.

Nous n'avons pas trouvé de données dans la littérature concernant la bioaccumulation des différentes formes chimiques de Se chez ces organismes. En effet, les études réalisées sur les bivalves ne s'intéressent qu'au sélénite dissous, ou bien à son transfert par la voie trophique.

Chez la moule *Mytilus edulis*, le sélénium présent naturellement, se retrouve essentiellement au niveau des branchies et du manteau, puis, de la masse viscérale et des muscles (Fowler et Benayoun, 1976). Ces auteurs montrent qu'après une contamination au ⁷⁵sélénite dissous, le sélénite s'accumule dans tous les organes de la moule, mais préférentiellement au niveau de viscères (puis au niveau des branchies, du muscle et enfin du manteau). Au bout de 63 jours le BCF a une valeur d'environ 100, mais le plateau n'est toujours pas atteint (Fowler et Benayoun, 1976). Zhang *et al.* (1990) montrent que la bioaccumulation du ⁷⁵sélénite est plus importante par la voie trophique que par la voie directe, de plus d'un ordre de grandeur. Ces auteurs soulignent que par la voie directe, le sélénite est principalement accumulé ou fixé sur la coquille (> 50 %). Au niveau du corps mou, la masse viscérale et les branchies sont les organes cibles. Chez la crevette *Lysmata seticaudata*, après contamination par la voie directe avec du ⁷⁵Sélénite, la plus forte concentration de Se est retrouvée au niveau de l'exosquelette (BCF = 10 – 30) (Fowler et Benayoun, 1976). En ce qui concerne le modèle biologique poisson, les études rapportées sur *Lepomis macrochirus* montrent une biodisponibilité faible des formes inorganiques de Se avec un BCF < 5 après 60 jours d'exposition (Cleveland *et al.*, 1993).

La localisation intracellulaire du sélénium a été étudiée chez les bactéries contaminées avec du sélénite, pour lesquelles on observe classiquement l'apparition de granules denses aux électrons dans le cytoplasme, signe d'une détoxification par réduction du sélénite en sélénium élémentaire (Garbisu *et al.*, 1996; Kessi *et al.*, 1999; Roux *et al.*, 2001). Chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, Morlon *et al.* (2005) ont observé du sélénium associé à du calcium et du phosphore, à l'intérieur de vacuoles granuleuses, après exposition à du ⁷⁵Selenite. En ce qui concerne la localisation cellulaire du sélénium, des granules minéraux constitués d'agglomérats de particules cristallines dans le foie des cétacés dentés, otaries et cormorans ont été observés (Nigro et Leonzio, 1996). Ces granules, contenant du Hg et du sélénium étaient principalement localisés dans le cytoplasme et les macrophages.

Tableau 4 : Facteurs de bioconcentration (BCF) et efficacités d'assimilation (AE) du sélénium par la voie trophique (non exhaustif).

Modèle biologique	Biotope	Forme chimique de Se initiale	Temps d'exposition	BCF p.s. ou AE	Référence bibliographique
<i>Lepomis macrochirus</i> poisson	dulçaquicole	SeMet	90 jours	BCF 0,5 – 1,0	Cleveland <i>et al.</i> , 1993
<i>Brachionus calyciflorus</i> rotifère	dulçaquicole	Algues contaminées avec du séléniate	11 – 20 jours	BCF 500	Dobbs <i>et al.</i> , 1996
<i>Pimephales promelas</i> poisson	dulçaquicole	Rotifères contaminés avec du séléniate	11 jours	BCF 154 - 400	Dobbs <i>et al.</i> , 1996
<i>Lysmata seticaudata</i> Crevette	marin	Moules contaminée avec du sélénite	6-52 jours	BCF 6-20	Fowler et Benayoun, 1976
<i>Macoma balthica</i> bivalve	marin	Diatomées contaminées avec du sélénite Se élémentaire (bioréduction du sédiment contaminé avec du sélénite)	2.5 heures	AE 86 % AE 22 %	Luoma <i>et al.</i> , 1992
<i>Elminius modestus</i> patelle	marin	Phytoplancton contaminé avec du sélénite Zooplancton contaminé avec du sélénite	30-45 minutes	AE 34-66 % AE 74 %	Rainbow et Wang, 2001
<i>Crassostrea virginica</i> bivalve	marin	Phytoplancton contaminé avec du sélénite	40-60 minutes	AE 70 %	Reinfelder <i>et al.</i> , 1997
<i>Macoma balthica</i> bivalve	marin	Phytoplancton contaminé avec du sélénite	40-60 minutes	AE 78 %	Reinfelder <i>et al.</i> , 1997
<i>Mercenaria mercenaria</i> bivalve	marin	Phytoplancton contaminé avec du sélénite	40-60 minutes	AE 92 %	Reinfelder <i>et al.</i> , 1997
<i>Mytilus edulis</i> bivalve	marin	Phytoplancton contaminé avec du sélénite	40-60 minutes	AE 86 %	Reinfelder <i>et al.</i> , 1997
<i>Menidia menidia</i> poisson juvenile	marin	Zooplancton contaminé avec du sélénite	1-4h	AE 29 %	Reinfelder et Fisher, 1994

1.1.5.3. Bioaccumulation du sélénium par la voie trophique

Très peu d'études se sont intéressées au transfert trophique en prenant en compte les formes chimiques de sélénium initiales. Seule une étude montre chez le poisson chat *Ictalurus punctatus* que la SeMet est mieux bioaccumulée que le sélénite lorsque ces formes sont incorporées dans la nourriture (Wang et Lovell, 1997). La plupart des études de transfert trophique réalisées ont utilisé le sélénite comme première source de sélénium.

Les principales données trouvées dans la littérature sont résumées dans le Tableau 4. L'étude du transfert trophique du sélénium au clam *Puditapes philippinarum* (phytoplancton marin *Phaeodactylum tricornutum* contaminé avec du ⁷⁵sélénite) montre que l'accumulation est un processus rapide, et induit une contamination plus importante que par la voie directe (Zhang *et al.*, 1990). Après 18 jours de contamination, l'accumulation du sélénium se fait essentiellement au niveau des viscères puis des branchies. De même, le poisson *Lepomis macrochirus* accumule plus de sélénite par la voie trophique que par la voie directe (Besser *et al.*, 1993). L'accumulation du sélénite par ces deux voies seraient additives chez *Lepomis macrochirus* (Besser *et al.*, 1993) et *Pimephales promelas* (Bertram et Brooks, 1986). Bertram et Brooks (1986) indiquent que les taux de dépuración du sélénite suggèrent l'existence de 2 compartiments fonctionnels : un pool de Se non lié (inorganique) correspondant à une dépuración rapide (voie directe) et un pool de Se organiquement lié correspondant à une dépuración dépendante du métabolisme cellulaire (voie trophique).

Chez la crevette *Lysmata seticaudata*, le sélénium apporté par la voie trophique (broyat de *Mytilus galloprovincialis* contaminé avec du ⁷⁵sélénite) s'accumule principalement au niveau de la masse viscérale (BCF = 6 –20) (Fowler et Benayoun, 1976).

Plusieurs études concernant l'efficacité d'assimilation (AE¹) du sélénium ont été réalisées, et notamment sur bivalves marins. Le bivalve *Macoma balthica* a une efficacité d'assimilation du sélénium de 86 % lorsqu'il est nourri avec des diatomées pré-exposées au sélénite et de 22 % lorsqu'il est nourri avec du sélénium élémentaire (sédiment contaminé en ⁷⁵sélénite ayant subi une réduction bactérienne) (Luoma *et al.*, 1992). Chez la patelle *Elminius modestus* nourrie avec du phytoplancton contaminé en ⁷⁵sélénite, l'efficacité d'assimilation du sélénium varie de 34 à 66 %. Lorsqu'elle est nourrie avec du zooplancton, son efficacité d'assimilation est plus importante, de l'ordre de 74 % (Rainbow et Wang, 2001).

¹AE : L'AE est le pourcentage de Se restant dans l'organisme après la vidange du tube digestif, par rapport à la quantité totale ingérée.

Chez quatre bivalves marins (*Crassostrea virginica*, *Macoma balthica*, *Mercenaria mercenaria* et *Mytilus edulis*), il a été montré que l'efficacité d'assimilation du sélénium était proportionnelle à la fraction de Se présente dans le cytoplasme des algues ingérées (*Isochrysis galbana* contaminé en ⁷⁵sélénite), avec une efficacité d'assimilation comprise entre 72 et 92 % (Reinfelder *et al.*, 1997). Chez l'amphipode *L. plumulosus*, il n'y a pas de relation entre Se dans le cytoplasme des cellules algales et efficacité d'assimilation (Schlekat *et al.*, 2002). Par contre, ces auteurs ont montré que l'efficacité d'assimilation du sélénium chez le bivalve *Macoma balthica*, variait proportionnellement à la fraction de Se cytoplasmique dans les algues ingérées et que le bivalve *Potamocorbula amurensis* pouvait assimiler du sélénium non cytoplasmique à partir du phytoplancton.

En ce qui concerne les consommateurs secondaires, l'étude du transfert trophique entre des rotifères contaminés avec du séléniate et le poisson, montre un assez important facteur de bioconcentration (BCF = 154-400 p.s.), cependant il est inférieur à celui calculé lors du transfert entre algues et rotifères (BCF = 500 p.s.) (Dobbs *et al.*, 1996). Il a été montré que l'efficacité d'assimilation du sélénium entre le copépode *Acartia sp.* (exposé au ⁷⁵Sélénite) et le poisson juvénile *Menidia sp.* n'était que de 29 % (Reinfelder et Fisher, 1994). Ceci est à mettre en relation avec le fait que le ⁷⁵Sélénite s'accumulait à 60 % dans l'exosquelette des copépodes. Le poisson devait absorber les tissus mous des copépodes et rejeter l'exosquelette chitineux. Ainsi, outre l'effet de la spéciation des polluants, les mécanismes de nutrition et de digestion propres à chaque organisme modulent les entrées du polluant et conditionnent l'efficacité d'assimilation d'un polluant.

1.1.6. Rôle physiologique et toxicité du sélénium

Le sélénium est essentiel pour la plupart des organismes vivants, mais dans une gamme de concentrations très étroite, au-delà de laquelle il devient toxique (Hodson et Hilton, 1983; EPA, 2004).

A faible concentration, il permet de lutter contre les dommages engendrés par le stress oxydant, par sa présence au niveau de la glutathion peroxydase sélénium dépendante (Himeno et Imura, 2000; Arteel et Sies, 2001; Tapiero *et al.*, 2003; Tinggi, 2003; Ducros et Favier, 2004). Cependant, il peut exercer des effets toxiques à de plus fortes concentrations.

Parmi tous les polluants classés comme prioritaires, le sélénium est celui qui se caractérise par la gamme la plus étroite entre les concentrations bénéfiques pour le biota et les concentrations délétères. Ainsi, la concentration nécessaire au maintien des processus métaboliques est de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.s. pour les organismes aquatiques et terrestres. Des concentrations supérieures à ce seuil d'un ordre de grandeur, pourraient être toxiques chez le poisson (EPA, 2004). Des concentrations inférieures à $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (poids sec) dans la nourriture de la truite arc-en-ciel peuvent conduire à des symptômes de déficience sévère, tandis qu'au-dessus de $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, des effets toxiques commencent à se manifester (Hodson et Hilton, 1983). Chez le poisson, la toxicité (sur la reproduction et le développement) peut se manifester suite à des expositions chroniques dans l'eau $< 5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Lemly, 1999).

1.1.6.1. Rôles physiologiques

Le sélénium est un élément essentiel pour la majorité des organismes vivants, indispensable comme cofacteur minéral pour la biosynthèse de la glutathion peroxydase (GPx) (Himeno et Imura, 2000; Arteel et Sies, 2001; Tapiero *et al.*, 2003; Tinggi, 2003; Ducros et Favier, 2004).

De plus, chez les mammifères 30 sélénoprotéines ont été identifiées, ayant un rôle physiologique de première importance ou bien non encore identifié (Arteel et Sies, 2001). Jusqu'à présent, les protéines caractérisées fonctionnellement (12) contiennent toutes l'acide aminé SeCyst.

Parmi les différentes sélénoprotéines connues, on peut notamment citer (Himeno et Imura 2000, Arteel, 2001, Ducros et Favier 2004) :

La famille des GPx

Les GPx, enzymes antioxydantes, constituent une des principales lignes de défense contre les agressions produites par les radicaux libres de l'oxygène.

Dans la famille des GPx (subdivisée en 4), la plus abondante chez l'animal est la GPx cellulaire (Himeno et Imura, 2000). Localisée essentiellement dans le cytosol, son rôle est de piéger le H_2O_2 (alors que le H_2O_2 produit dans les peroxysomes est piégé par la catalase localisée dans ces organites). La GPx membranaire (phospholipide hydroperoxyde GPx) a un rôle dans la protection des biomembranes contre la peroxydation lipidique. Il existe également la GPx extracellulaire (plasmatique) et la GPx gastrointestinale qui, elles aussi, inhibent la production de radicaux libres (Ducros et Favier, 2004).

Thiorédoxine réductase

Elle est située dans le cytoplasme des cellules et catalyse la réduction de la thiorédoxine, qui est une protéine de faible poids moléculaire responsable de la réduction de biomolécules oxydées. La réduction de la thiorédoxine serait un mécanisme important de régulation de la croissance cellulaire normale ou tumorale, mais aussi de la mort cellulaire programmée (Ducros et Favier, 2004).

Sélénoprotéine P

Elle est principalement localisée dans le plasma et a la particularité de posséder 10 atomes de Se par polypeptide. Sa fonction n'a pas encore été élucidée (Ducros et Favier, 2004). On lui attribue plusieurs rôles : un rôle antioxydant extracellulaire et une activité peroxydase spécifique des phospholipides.

En plus de l'action de ces sélénoprotéines, un effet anticancer du sélénium est attribué à certains métabolites du sélénium (Tapiero *et al.*, 2003).

1.1.6.2. Mécanismes de toxicité

Substitution Soufre-Sélénium

La première cause de toxicité du sélénium est une erreur dans le processus de synthèse protéique (Lemly, 2002b). Le soufre, constituant clé des protéines, forme des ponts disulfures entre les différents acides aminés ce qui confère à la protéine sa structure tertiaire. Cette structure est nécessaire pour le bon fonctionnement des protéines en tant que composant cellulaire ou enzyme. Lorsque le sélénium est présent en trop grande quantité, il se substitue au soufre et forme des ponts triséleriures (Se-Se-Se) ou sélénotrisulfure (S-Se-S) ce qui empêche la formation des ponts disulfures nécessaires. Les protéines ne sont alors plus fonctionnelles et ne peuvent plus jouer leur rôle. Les conséquences peuvent être nombreuses, la plus documentée est un effet tératogène chez le poisson (Lemly, 1993b).

Le sélénium peut se substituer au soufre pour former de la SeMet. L'incorporation de la SeMet à la place de la méthionine (Met) n'altère pas la structure des protéines mais peut influencer l'activité des enzymes si la SeMet remplace la Met à proximité du site actif (Schrauzer, 2000). Chez les plantes, la toxicité du sélénium peut être expliquée par la participation de la SeMet (à la place de la Met) dans l'initiation du processus de traduction qui diminuerait le taux de synthèse protéique (Eustice *et al.*, 1981).

Tableau 5 : Données d'écotoxicité du sélénium

Modèle biologique	Voie de contamination	Forme chimique de Se	Effet observé, durée, et critère statistique choisi	Valeur	Référence bibliographique
<i>Anabaenas flos aquae</i> cyanobactérie	Directe	sélénite	Diminution chlorophylle a après 2 et 4 jours, LOEC	LOEC 4 jours = 3 mg·L ⁻¹	Kiffney et Knight, 1990
		séléniate		LOEC 4 jours = 3 mg·L ⁻¹	
		SeMet		LOEC 2 jours = 0.1 mg·L ⁻¹	
<i>Thalassiosira pseudonana</i> algue	Directe	sélénite	Inhibition du taux de croissance en phase exponentielle, LOEC et EC ₁₀₀	LOEC > 79 mg·L ⁻¹	Price <i>et al.</i> , 1987
		Séléniate		LOEC < 79 µg·L ⁻¹	
		séléniate		EC ₁₀₀ 79 mg·L ⁻¹	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> algue	Directe	séléniate	Inhibition de croissance en état stationnaire, EC ₅₀	IC ₅₀ = 800 µg·L ⁻¹	Bennett, 1988
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> algue verte	Directe	sélénite	Inhibition de croissance à 96h, EC ₅₀	IC ₅₀ 96h = 6320 µg·L ⁻¹	Morlon <i>et al.</i> , 2005
<i>Corophium sp.</i> amphipode	Directe	sélénite	Survie à 96h, NOEC et LC ₅₀	NOEC = 58 µg·L ⁻¹	Hyne <i>et al.</i> , 2002
		séléniate		NOEC = 116 µg·L ⁻¹	
		SeMet		LC ₅₀ 96h = 1.5 µg·L ⁻¹	
		sélénocystine		LC ₅₀ 96 h = 12.7 µg·L ⁻¹	
<i>Perna perna</i> moule	Directe	sélénite	Diminution du débit ventilatoire après 1h, EC ₅₀ Augmentation du débit ventilatoire après 1h, EC ₅₀	EC ₅₀ 1h = 200 µg·L ⁻¹ EC ₅₀ 1h ~ 500 µg·L ⁻¹	Watling et Watling, 1982
Mâle Kunming souris	Trophique	sélénite Se élémentaire	Inhibition de croissance, après 12 jours, EC ₁₀₀ Inhibition de croissance, après 12 jours, EC ₅₀	6 mg·kg ⁻¹ ·j ⁻¹	Zhang <i>et al.</i> , 2005
Kératinocytes de souris	Directe (cultures cellulaires)	sélénite Sélénocystamine (C ₄ H ₁₂ N ₂ Se ₂)	Apoptose après 24h, EC ₁₀₀	EC ₁₀₀ 24 h = 25 mg·L ⁻¹ EC ₁₀₀ 24 h = 250 mg·L ⁻¹	Stewart <i>et al.</i> , 1999

Formation de radicaux libres

La toxicité du sélénium peut provenir de la génération d'anions superoxydes due à l'interaction du sélénium avec des groupements thiols. Un important mécanisme met en cause la formation de méthyl sélénium CH_3Se^- qui, soit entre dans le cycle redox et génère du superoxyde ou un stress oxydant, ou bien forme des radicaux libres qui se lient à d'importantes enzymes ou protéines et les inhibent. Par exemple, la SeMet peut donner du méthylsélénol et générer un superoxyde en présence de glutathion (Palace *et al.*, 2004).

Accumulation de séléniure d'hydrogène

Un second mécanisme met en cause la SeCyst, qui, présente en excès, induit l'inhibition du métabolisme de méthylation du sélénium, engendrant une accumulation de séléniure d'hydrogène (métabolite intermédiaire) dans les animaux et pouvant ainsi causer des troubles hépatocytaires (Nakamuro *et al.*, 2000).

1.1.6.3. Données d'écotoxicité concernant les organismes aquatiques et terrestres

Quelques études ont été réalisées concernant la toxicité des différentes formes de sélénium sur les organismes vivants. Les données de toxicité trouvées dans la littérature (aussi bien au niveau de la reproduction, de la croissance, que des activités enzymatiques) sont rapportées dans le Tableau 5.

Organismes aquatiques

La cyanobactérie *Anabaenas flos aquae* est 30 fois plus sensible à la SeMet qu'au sélénium inorganique (aussi bien sélénite que séléniate). Le premier effet (LOEC) sur la synthèse de la chlorophylle a a été observé après une exposition de 4 jours à $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($38 \mu\text{M}$) de sélénium inorganique (séléniate, sélénite) *versus* après une exposition de 2 jours à $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de SeMet (Kiffney et Knight, 1990).

Les concentrations essentielles et toxiques de sélénite et séléniate pour la croissance de la diatomée marine *Thalassiosira pseudonana*, ont été évaluées (Price *et al.*, 1987). Les résultats indiquent que cette algue est plus sensible au séléniate qu'au sélénite. Une légère inhibition du taux de croissance en phase exponentielle est observée chez *T. pseudonana* à partir des concentrations supérieures à 1 mM (79 mg·L⁻¹) de sélénite (LOEC). Aucune déficience de croissance n'a été observée pour des valeurs atteignant 1 nM (79 ng·L⁻¹).

En ce qui concerne le séléniate, pour des concentrations inférieures à 0.1 μM (7,9 μg·L⁻¹), *Thalassiosira* a des difficultés à croître, le taux de croissance ne représente qu'un quart de la croissance maximale. L'addition de 1 mM (79 mg·L⁻¹) de séléniate à la culture est toxique et la croissance est complètement inhibée.

Chez l'amphipode *Corophium sp.* les acides aminés séléniés, séléno-L-méthionine et séléno-DL-cystine, sont plus toxiques (LC₅₀ 96h = 1.5 et 12.7 μg·L⁻¹) que les formes inorganiques, sélénite et séléniate (NOEC 96h = 58 et 116 μg·L⁻¹) (Hyne *et al.*, 2002).

Une inhibition de croissance de 50 % chez *Chlorella pyrenoidosa* a été rapportée pour une concentration de 800 μg·L⁻¹ (10 μM) de séléniate dans le milieu (Bennett, 1988).

Chez *E. Coli*, la thymidylate synthase ayant de la SeMet substituée à la Met, présente une activité spécifique 40 fois plus importante que l'enzyme normale. De même, si plus de la moitié des 150 résidus de Met sont substitués par de la SeMet, la β Galactosidase est inactive (Schrauzer, 2000).

Des effets toxiques du sélénite ont pu être observés en termes de modifications de l'ultrastructure de cellules algales (Morlon *et al.*, 2005) et de lamelles branchiales de poisson (Lemly, 1993a). Les effets pathologiques observés par Lemly (1993b) au niveau de la branchie du poisson téléostéen *Lepomis cyanellus* (exposés à une contamination au sélénium dans le lac Belews, Caroline du Nord, US) sont une dilatation des sinus et un gonflement des lamelles branchiales. Cette dilatation des lamelles branchiales due au sélénium, pose des problèmes de flux sanguin, d'échanges gazeux inefficaces et une réponse métabolique accrue (augmentation de la demande respiratoire et de la consommation d'oxygène). Des effets tératogènes ont aussi été observés dans ce lac. Des effets sur la reproduction et le développement du poisson peuvent se manifester suite à des expositions chroniques dans l'eau à des concentrations de Se inférieures à 5 μg·L⁻¹ (Lemly, 1999).

Des dommages ultrastructuraux chez la daphnie ont été observés dès 16 h d'exposition à $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de sélénite (Schultz *et al.*, 1980). Dans tous les tissus observés (muscles, nerf), les premiers organites touchés étaient les mitochondries. Elles commençaient par gonfler et semblaient se désorganiser. Le gonflement était suivi par l'apparition de granules denses dans la matrice mitochondriale. Les mitochondries pouvaient finir par dégénérer avec le temps.

Mammifères terrestres

Plusieurs auteurs ont montré une toxicité du sélénium chez la souris qui était largement dépendante de la forme chimique de Se considérée. Ainsi, Zhang *et al.* (2005), montrent que le sélénite présente une toxicité plus importante que le sélénium élémentaire pour la souris. Ils observent dans le foie de souris, après administration de sélénite, une diminution de la catalase et de la superoxyde dismutase, une augmentation du malonaldéhyde A, ainsi qu'une diminution du glutathion et parallèlement, une augmentation des glutathion peroxydase et transférase. Les modifications de ces marqueurs sont le signe d'un stress oxydant après exposition au sélénite.

Stewart *et al.* (1999), montrent également par des études *in vitro* sur cultures cellulaires de souris, que le sélénium peut induire un stress oxydant et l'apoptose. Ils montrent que le sélénite et la sélénocystamine crée des adduits à l'ADN, l'apoptose et qu'ils sont cytotoxiques pour les kératinocytes de souris. En revanche, aucun effet n'était observé après exposition à la SeMet.

La dose létale moyenne de SeMet (LD_{50}) chez des rats ayant reçu une injection intraperitonéale est de $4.25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ et ainsi, comparable à celle du sélénite et séléniate. Les 2 isomères de la SeMet (L- et D- séléno-méthionine) présentent la même toxicité chez le rat et sont tous les 2 accumulés dans le muscle squelettique, cœur, foie et érythrocytes à des degrés équivalents, il n'y a que le taux de Se plasmatique qui est plus faible dans le cas de la séléno-L-méthionine (Schrauzer, 2000).

Il a également été montré que le sélénite de sodium pouvait altérer le potentiel de membrane de la mitochondrie et donc contribuer à l'apoptose (Kim *et al.*, 2002) chez le rat. L'oxydation des groupements thiols par le sélénite, entraînerait une chute du potentiel de membrane mitochondriale engendrant un relargage de cytochrome c, conduisant à l'apoptose. L'effet anticancer du sélénium pourrait être du à ce phénomène.

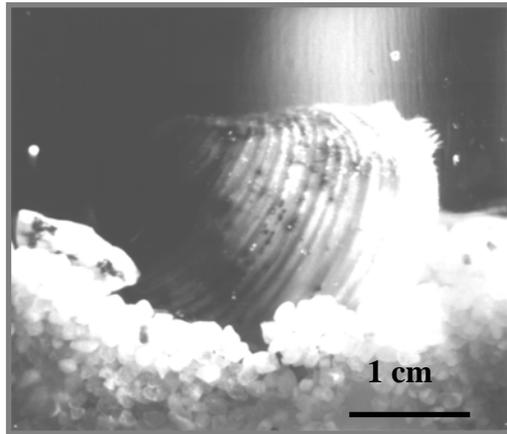


Figure 5 : Modèle biologique, *C. fluminea*, positionné dans le substrat.

1.2. Le modèle biologique étudié : *Corbicula fluminea*

Le bivalve *Corbicula fluminea* a été choisi car il est très représentatif des écosystèmes aquatiques continentaux. Il peut être retrouvé dans de nombreux écosystèmes aussi bien lotiques que lenticques. D'autre part, sa physiologie respiratoire a largement été étudiée récemment (Tran *et al.*, 2000; Tran *et al.*, 2001; Tran *et al.*, 2002; Tran *et al.*, 2003; Fournier *et al.*, 2004; Tran *et al.*, 2004a; Tran *et al.*, 2004b).

1.2.1. Origine

C. fluminea ou palourde asiatique est un bivalve d'eau douce fouisseur vivant à l'interface entre le substrat et la colonne d'eau (Figure 5). C'est une espèce invasive qui a tout d'abord colonisé les continents asiatique, africain, australien et la Nouvelle Guinée, pour ensuite coloniser le continent nord américain. Elle est à l'heure actuelle en pleine phase d'expansion en Europe. Des densités allant jusqu'à 2500 individus·m⁻² ont été rencontrées au sein de rivières anglaises (Aldridge et Muller, 2001).

1.2.2. Intérêt écotoxicologique : espèce bioindicatrice

C. fluminea est un modèle biologique très utilisé en écotoxicologie aquatique. Il répond aux critères d'un bon bioindicateur de pollution : il est présent en grande quantité, il est sédentaire, ubiquiste, de collecte facile, de taille et de durée de vie nécessaire et suffisante (3-4 ans) et il possède une relativement large résistance aux pollutions.

1.2.3. Ecologie

C. fluminea est une espèce benthique peu exigeante quant à son habitat. Elle colonise aussi bien les systèmes lotiques que lenticques. Espèce opportuniste, elle préfère les substrats composés de sable et de graviers, mais peut s'accommoder de substrats mous comme les fonds vaseux. Elle peut coloniser des milieux dont les températures extrêmes sont comprises entre 2 et 34 °C. L'optimum thermique se situe entre 20 et 25 °C (Foe et Knight, 1986). Elle peut vivre dans des milieux dont la salinité est comprise entre 0 à 3 ‰ (Gunther *et al.*, 1999).

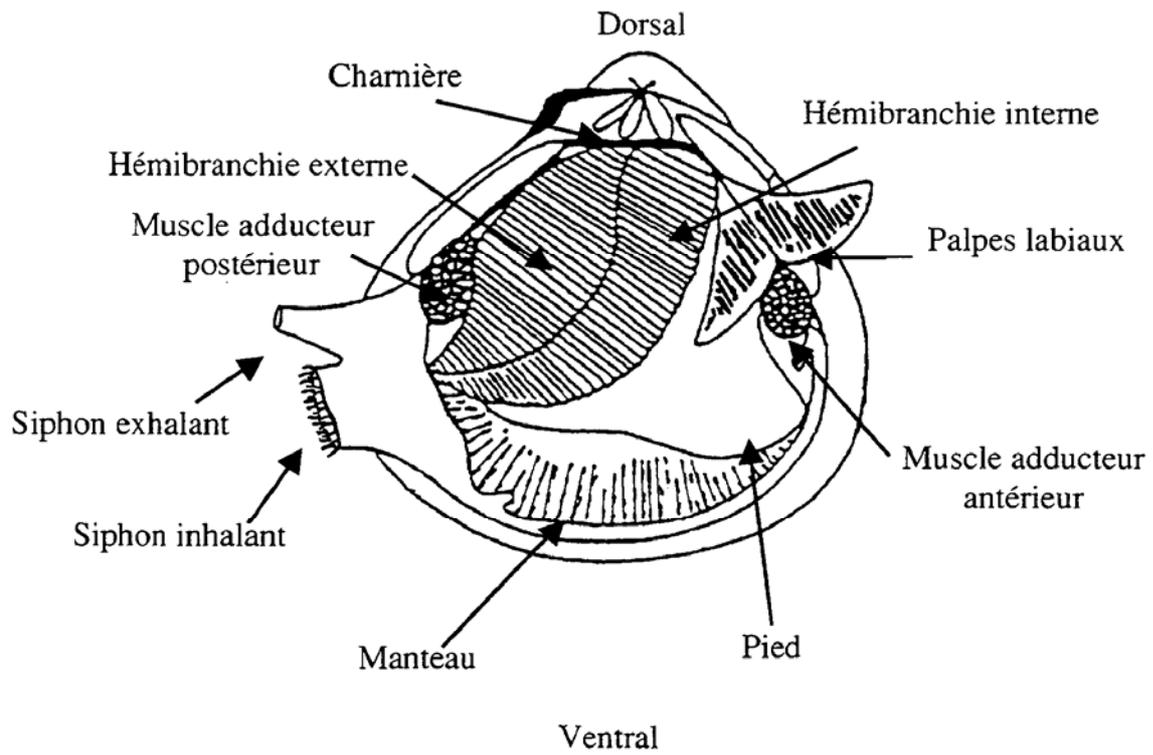


Figure 6 : Schéma des principaux organes de *C. fluminea* (Britton et Morton, 1982).

Une tolérance de *C. fluminea* à des salinités allant jusqu'à 13 ‰ a été décrite par certains auteurs (Morton et Tong, 1985). Son régime alimentaire est microphage sélectif, se nourrissant préférentiellement d'algues, organismes zooplanctoniques, bactéries et débris organiques. Il s'agit d'une espèce hermaphrodite (Dillon, 2000).

1.2.4. Anatomie et physiologie

Dans un contexte de bioaccumulation de contaminants, on peut distinguer 2 compartiments chez *C. fluminea* : la coquille (ou exosquelette), formée de 2 valves équilatérales et le corps mou qui comprend la masse des organes (Figure 6). Le manteau recouvre entièrement la face interne de la coquille et englobe l'ensemble du corps mou. Les 2 lobes du manteau fusionnent postéro-latéralement pour former les siphons inhalant et exhalant. Les branchies permettent à *C. fluminea* de filtrer l'eau pour assurer les échanges respiratoires (l'eau passe sur l'épithélium respiratoire des branchies où l'oxygène va diffuser de l'eau vers le sang) et se nourrir en piégeant des particules dont la taille peut atteindre quelques μm (algues unicellulaires phytoplanctoniques, bactéries ou bien particules organiques). L'eau entre par le siphon inhalant, circule dans la cavité palléale et les branchies pour ressortir par le siphon exhalant.

L'activité ventilatoire est provoquée par les battements des cils latéraux situés sur les branchies. Les mouvements des valves ne sont pas responsables de l'arrivée de l'eau sur les surfaces d'échange, mais leur fermeture interdit toute circulation d'eau en protégeant la masse des organes. Les muscles adducteurs sont à l'origine de l'activité valvaire. Le pied de *C. fluminea* sert à la locomotion dans le substrat.

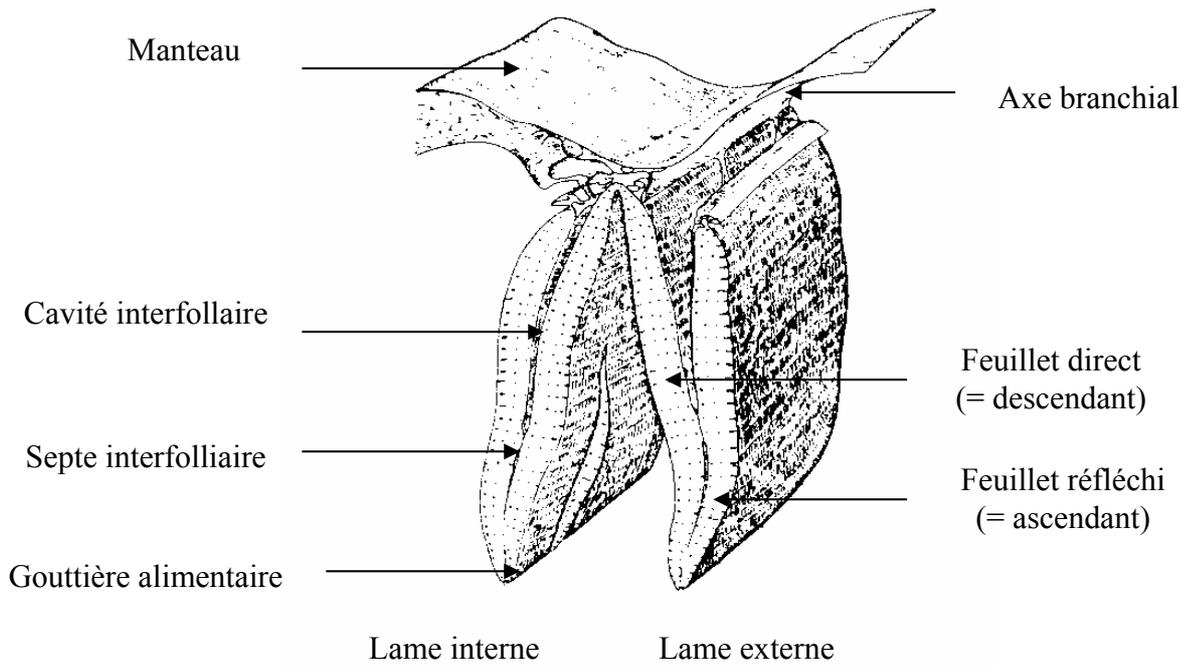


Figure 7 : Représentation schématique de la branchie de bivalve (Le Pennec *et al.*, 2003)

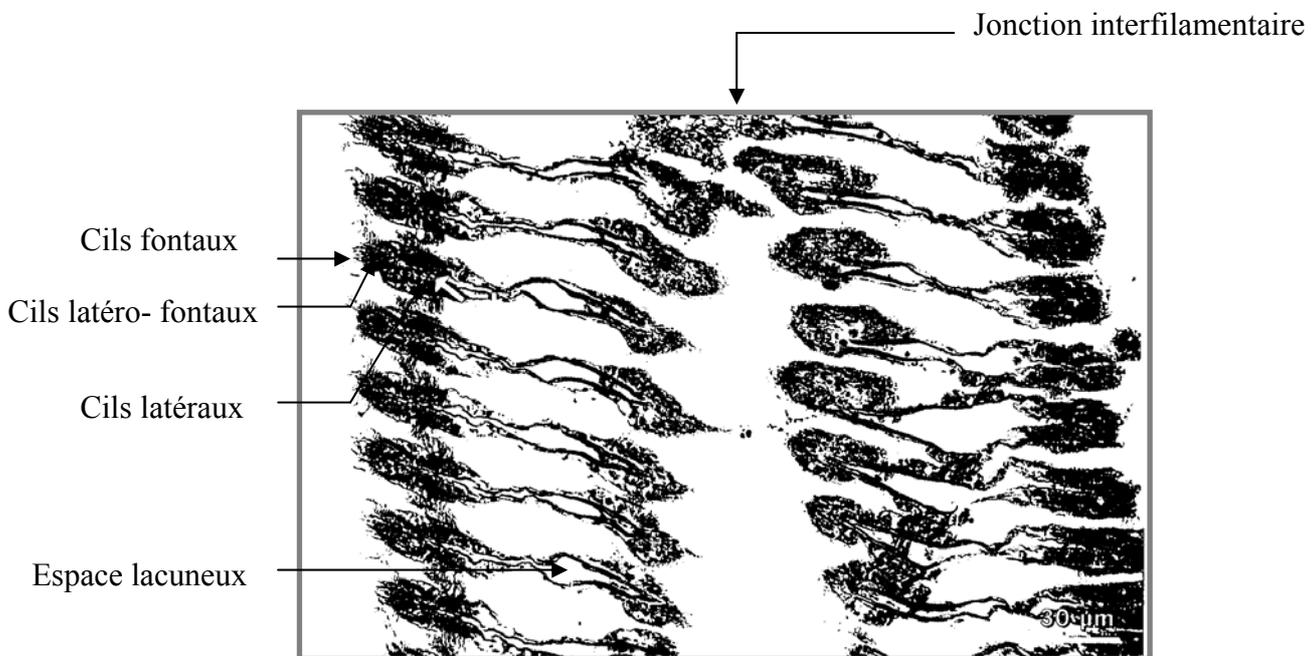


Figure 8 : Organisation d'une branchie à filaments réfléchis (*Mytilus edulis*)

(d'après Le Pennec *et al.*, 2003)

1.2.5. Branchies et mécanique ventilatoire

1.2.5.1. Anatomie des branchies

La branchie existe de chaque côté du corps sous forme de 2 lames, externe et interne (Figure 7). Chaque lame est constituée d'un feuillet descendant et d'un feuillet ascendant reliés à l'axe branchial. C'est dans cet axe que se trouvent les troncs vasculaires afférent et efférent et les principaux muscles assurant les mouvements branchiaux (Le Pennec *et al.*, 2003). L'élément de base de la branchie est le filament. Tous les filaments sont disposés en série, parallèles entre eux. Chez *C. fluminea*, comme chez tous les eulamellibranches, ils sont longs étroits et réfléchis (Figure 8). Sur une même lame, tous les feuillets sont semblables, on parle de branchie lisse. La ciliature des filaments consiste essentiellement en cils frontaux, latéro-frontaux et latéraux. L'eau circule dans le tissu branchial grâce au mouvement des cils latéraux. On considère que les ostiums participent, en fonction de leur degré d'ouverture/fermeture, à la régulation du débit. Chaque filament est soutenu par un tissu conjonctif, par des fibres musculaires et un tissu de soutien (chitine).

1.2.5.2. Fonction des branchies

Les branchies remplissent plusieurs fonctions : l'hématose du sang et la capture de particules alimentaires. Les cellules ciliaires et à mucus attirent, sélectionnent, capturent et conduisent les particules vers les palpes et la bouche. L'intensité de l'activité dépend de nombreux facteurs extérieurs déclencheurs comme la température, la charge particulaire et de facteurs internes de régulation (Tran *et al.*, 2002; Le Pennec *et al.*, 2003).

1.2.5.3. Mécanique ventilatoire

La régulation du débit ventilatoire dépend d'une part de l'activité des cils et d'autre part de la contraction des muscles branchiaux (Gardiner *et al.*, 1991; Medler et Silverman, 2001; Gainey *et al.*, 2003).

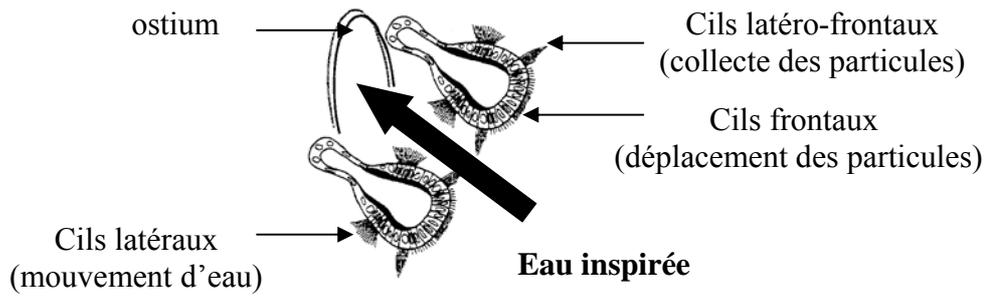


Figure 9: Schéma de deux filaments branchiaux montrant les cils impliqués dans l'activité ventilatoire du bivalve (modifié d'après Jorgensen, 1990).

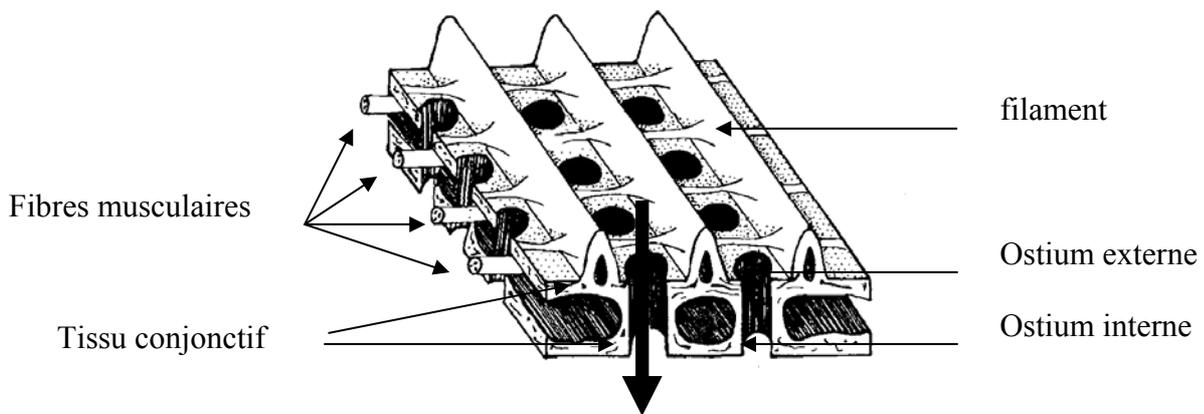


Figure 10 : Structure branchiale (d'après Medler et Silverman, 2001).

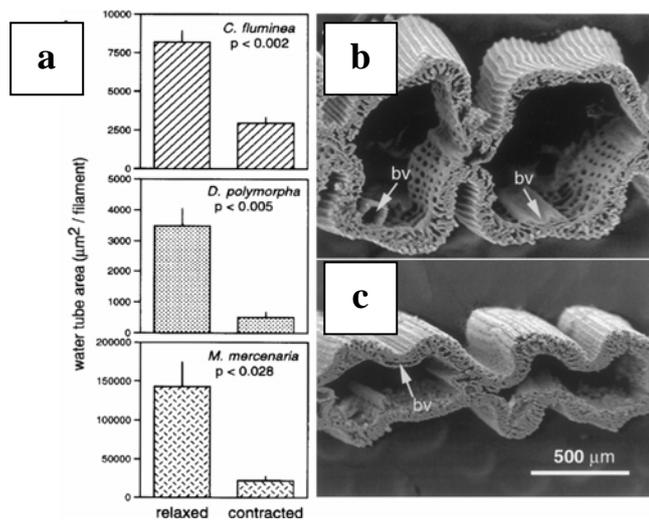


Figure 11 : a. Dimension des tubes aquifères chez 3 bivalves lors du relâchement et de la contraction musculaire de 3 bivalves. b : coupe transversale de branchies relâchées de *M. mercenaria* ; c : coupe transversale de branchies contractées de *M. mercenaria* (Gardiner et al., 1991).

Le rôle des cils

Les trois types de cils qui se trouvent sur les filaments ont chacun une fonction bien précise dans la mécanique ventilatoire (Figure 9). Les cils latéraux, situés dans les canaux interfilamentaires où se trouve un épithélium respiratoire, créent un mouvement d'eau et sont donc responsables de l'activité ventilatoire (Jorgensen, 1990). Il existe aussi les cils latéraux frontaux qui vont collecter les particules alimentaires (Silverman *et al.*, 1996). Les cils frontaux vont quant à eux vont fonctionner comme un tapis roulant sur lequel sont transportées les particules alimentaires pour être emportées vers les palpes labiaux, la bouche et le tractus digestif. Les particules sont piégées par un tapis de mucus et les cils frontaux déplacent ce mucus.

Le rôle des muscles

Le diamètre des passages d'eaux à travers les branchies dépend des contractions de la musculature branchiale (Figure 10). Jorgensen (1990) décrit la mécanique ventilatoire chez les bivalves filtreurs. Il indique que l'activité ventilatoire varie avec le degré d'ouverture des valves et l'ouverture des siphons. Suite à la fermeture des valves, une modification de l'extension du siphon et du manteau est observée, ce qui peut affecter la pompe branchiale en affectant les distances interfilamentaires. Les muscles qui rétractent le manteau et le siphon sont en continuation des muscles qui se trouvent à la base des branchies. Ainsi, la rétractation du manteau et siphon peut diminuer l'axe branchial et donc celui des hémibranchies. Une diminution des canaux interfilamentaires est alors constatée, cependant, la largeur des filaments reste identique. Cette réduction de la largeur du canal interfilamentaire (dérivée d'une fermeture des valves) participerait à la diminution du débit ventilatoire. Une relaxation excessive des muscles n'amplifie pas ou que très peu la capacité ventilatoire.

Medler et Silverman (2001), qui ont étudié l'effet d'une modification de la musculature branchiale de *C. fluminea* sur les processus de ventilation, indique que les muscles des Eulamellibranches sont organisés d'une façon à réguler la dimension des passages d'eau. Ils montrent que la contraction des muscles branchiaux diminue la distance interfilamentaire, la taille des ostiums internes et du tube aquifère (Figure 11). Ceci indique que l'altération du tonus musculaire des muscles lisses peut modifier le débit ventilatoire.

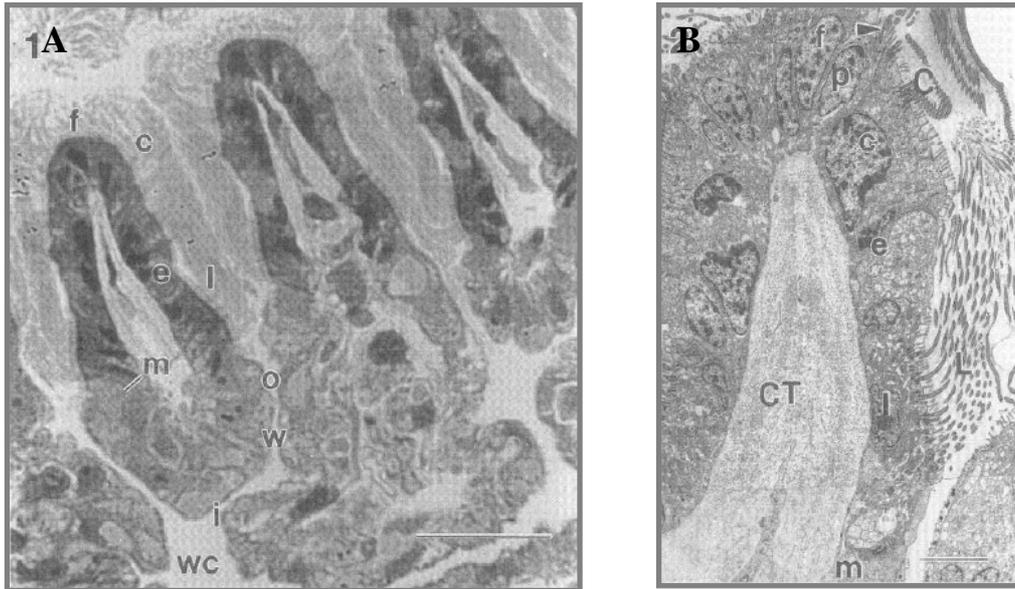


Figure 12 : A : Coupe transversale de branchie montrant 3 filaments chez *Dreissena polymorpha*. f : cils frontaux ; c : cils latéro-frontaux ; l : cils latéraux ; e : cellules épithéliales ; o : ostium ; i : ostium interne ; w : tube aquifère ; w : tube aquifère central ; trait = 25 μm . B : Détails des cellules épithéliales de filaments f : cellules épithéliales frontales ; p : cellules pro-latéro-frontales ; c : cellules latéro-frontales ; l : cellules épithéliales latérales ; e : cellules épithéliales indifférenciées ; m : cellules à mucus, ct : tissu conjonctif. trait = 5 μm (Silverman *et al.*, 1996).

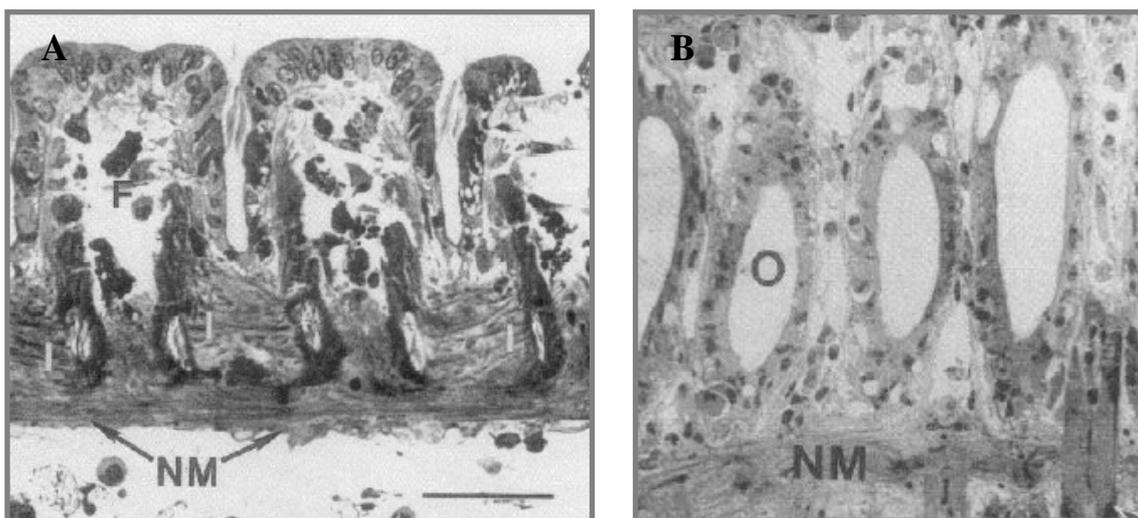


Figure 13 : A : Coupe transversale de branchie d'*Anodonta* (antério-postérieure de gauche à droite). B : Coupe transversale de filaments (dorso-ventral). F : filament ; NM : bande musculaire ; O : ostiums. trait = 50 μm . (d'après Gardiner *et al.*, 1991).

Gardiner *et al.* (2001), montrent que chez les moules d'eau douce, il existe 2 types de bandes de muscles striés. Il y a d'une part, les bandes de muscles situées à la base des filaments. Elles alternent avec les ostiums. Lors de la contraction de ces muscles, on a diminution du canal interfilamentaire. D'autres fibres musculaires se trouvent au niveau de l'épithélium qui borde le tube aquifère et autour de l'ostium interne. Ils contrôlent le diamètre des ostiums internes.

1.2.6. Facteurs du milieu influençant la physiologie respiratoire de *C. fluminea*

Certains facteurs du milieu sont susceptibles d'influencer l'activité valvaire (mouvement d'ouverture et de fermeture des valves) et ventilatoire des bivalves, ce qui peut entraîner des variations tout à fait importantes dans les taux d'accumulation d'un polluant (Tran *et al.*, 2001; Tran *et al.*, 2002; Tran *et al.*, 2004b). L'oxygène, la variation de concentration de plancton, la température, le stress ainsi que la nature du contaminant, sont parmi les facteurs qui peuvent entraîner des variations de débit ventilé.

Oxygénation du milieu

C. fluminea est capable de maintenir constante sa consommation d'oxygène lorsque l'oxygénation du milieu varie de l'hypoxie (10 % de saturation à l'air) jusqu'à l'hyperoxie (200 % de saturation à l'air) (Tran *et al.*, 2000). *C. fluminea* maintient l'homéostasie de son milieu intérieur en termes d'oxygénation *via* un ajustement de la ventilation et sans modification du débit cardiaque.

Ces changements d'oxygénation du milieu (de 4 à 40 kPa) modifient profondément les processus de contamination par le cadmium (Tran *et al.*, 2001). L'O₂ peut influencer les cinétiques de charge du polluant et l'organotropisme en modifiant les teneurs relatives de bioaccumulation dans les organes. Lorsque l'O₂ diminue dans le milieu, *C. fluminea* hyperventile pour maintenir constant l'approvisionnement en O₂ dans ses cellules. En hypoxie, les flux de cadmium traversant les cavités branchiales augmentent, l'hydrodynamisme de l'eau ventilée est modifié et l'animal se contamine plus vite par voie directe.

Tableau 6 : Facteurs environnementaux pouvant modifier la physiologie respiratoire de C. fluminea.

Facteur du milieu étudié	Effet physiologique observé	Référence bibliographique
Densité algale	Ajustement du débit ventilatoire	Tran <i>et al.</i> , 2002.
Température	Ajustement du débit ventilatoire	Tran <i>et al.</i> , 2002.
pO ₂	Ajustement du débit ventilatoire	Tran <i>et al.</i> , 2000 ; Tran <i>et al.</i> , 2004
pCO ₂	Ajustement du débit ventilatoire	Tran <i>et al.</i> , 2004
Polluant U	Fermeture des valves	Fournier <i>et al.</i> , 2004
Polluant Cd	Fermeture des valves	Tran <i>et al.</i> , 2003
Polluant Cu	Fermeture des valves	Tran <i>et al.</i> , 2004
Polluant U	Ajustement du débit ventilatoire Ajustement de l'ouverture/fermeture des valves	Tran <i>et al.</i> , 2004

Densité de phytoplancton

La nourriture a une influence fondamentale sur l'activité ventilatoire et ceci dépend de la température. A 15 °C, la ventilation dépend de l'apport trophique quand la concentration de plancton dans le milieu est $< 2 \cdot 10^5$ cells·mL⁻¹, tandis qu'à 25 °C la ventilation dépend de l'apport trophique quand la concentration de plancton est $< 5 \cdot 10^5$ cells·mL⁻¹ (Tran *et al.*, 2002).

Température

L'activité ventilatoire de *C. fluminea* dépend de la température *via* son influence sur le métabolisme. Une augmentation de métabolisme demande un approvisionnement en oxygène (comburant) et en nourriture (carburant) plus important, ainsi qu'une augmentation de la vitesse d'élimination du CO₂, un des produits finaux du métabolisme (Tran *et al.*, 2002). Le phénomène a été montré chez divers bivalves dont *Brachidontes striatulus* (Masilamoni *et al.*, 2002). Tran *et al.* (2002) montrent que les niveaux de base en termes de débit ventilatoire de *C. fluminea* sont de 12.8 mL·h⁻¹·g⁻¹ pour des concentrations de plancton non limitantes ($> 2 \cdot 10^5$ cells·mL⁻¹) à 15 °C et de 26.5 mL·h⁻¹·g⁻¹ pour des concentrations de plancton non limitantes ($> 5 \cdot 10^5$ cells·mL⁻¹) à 25 °C.

pH

Fournier *et al.* (2004) n'ont pas observé d'effet direct d'une modification du pH de 6.5 à 5.5 sur l'activité valvaire de *C. fluminea*, cependant un effet indirect a été observé. En présence d'uranium, la chute de pH entraîne une modification de la spéciation chimique de l'U(VI) en solution et entraîne la fermeture des valves. Une diminution des périodes d'activité a été observée chez un autre bivalve *Anadonta cygnea* quand le pH passait de 8 à 4 (Pynnönen et Huebner, 1995).

Présence d'un contaminant

Les bivalves possèdent un moyen de protection vis à vis de la survenue d'un contaminant qui est la fermeture rapide de leurs valves. Différents valvomètres actuellement sur le marché, permettent l'enregistrement de l'activité valvaire des bivalves.

L'enregistrement de ces mouvements peut être utilisé sur le terrain pour la détection de pollutions aiguës (Slooff *et al.*, 1983; Kramer *et al.*, 1989; Sluyts *et al.*, 1996) ou en laboratoire pour évaluer la toxicité de composés chimiques (Markich *et al.*, 2000). Les auteurs déterminent des seuils de sensibilité aux polluants pour une espèce de bivalve donnée, au-delà desquels l'activité valvaire de ces bivalves est perturbée (Markich *et al.*, 2000; Tran *et al.*, 2003; Fournier *et al.*, 2004; Tran *et al.*, 2004a). Des modifications de l'activité ventilatoire de *C. fluminea* ont également été rapportées dans la littérature. Tran *et al.* (2004) montrent une chute du débit ventilatoire en présence d'uranium. A notre connaissance, une seule publication (Watling et Watling, 1982) a rapporté des effets du sélénium au niveau de l'activité ventilatoire d'un bivalve. Chez la moule *Perna perna*, ils ont testé l'effet d'une exposition directe au sélénite sur 1 heure. Ils rapportent une inhibition de la ventilation à des concentrations de sélénite allant de 100 à 300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, une stimulation de 300 à 700 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et puis une inhibition aux valeurs plus élevées.

2. DEMARCHE EXPERIMENTALE ET PRINCIPAUX PARAMETRES ETUDIES

2.1.1. Démarche expérimentale

Le sélénium est présent dans l'environnement sous plusieurs états d'oxydation et sous diverses formes chimiques (§ 1.1.1.1). Il a été montré que sa bioaccumulation et sa toxicité dépendaient des différentes formes chimiques mises en jeu (§ 1.1.5 et 1.1.6). Les effets des différentes formes chimiques de Se sur sa biodisponibilité, sa bioaccumulation et sa toxicité ont été très étudiés chez les organismes phytoplanctoniques. En revanche, peu d'études se sont intéressées aux maillons trophiques supérieurs. De plus, l'étude de la voie trophique et de la voie directe sur un même modèle biologique a rarement été fait.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à un consommateur primaire, le bivalve d'eau douce *Corbicula fluminea*. Ce modèle biologique permet d'étudier aisément les 2 voies de contamination. Cependant, les données de la littérature indiquent que les bivalves sont très sensibles à leur environnement. Leur physiologie peut être profondément modifiée selon les conditions environnementales (§ 1.2.6).

Les nombreuses études menées par Tran *et al.* depuis 2000 sur la physiologie de *C. fluminea*, ainsi que les connaissances sur la bioaccumulation du sélénium issues de la littérature, conduisent à dire que deux paramètres vont pouvoir être impliqués dans les processus de bioaccumulation du sélénium chez ce bivalve, la spéciation chimique et la physiologie. Tran *et al.* (2004) le confirment avec l'exemple de l'uranium.

Nous nous sommes donc intéressés à l'impact du sélénium sur *C. fluminea*, en considérant d'une part les différentes formes chimiques de Se dans l'environnement et d'autre part la physiologie de l'organisme.

Nous avons choisi comme modèles biologiques l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* et le bivalve filtreur *C. fluminea* car leur physiologie a largement été étudiée (§ 1.2) et qu'ils sont représentatifs des écosystèmes aquatiques continentaux. Nous avons testé l'effet de 2 formes inorganiques de sélénium : sélénite et séléniate, car ce sont les formes majoritaires en milieu aquatique en conditions oxydantes à modérément oxydantes, ainsi qu'une forme organique, la SeMet, car il s'agit de la forme prédominante dans les tissus de plantes et algues (Guo et Wu, 1998; Tinggi, 2003) (§ 1.1.1.1).

Nos premières expérimentations ont été réalisées par des expositions à court terme (3 jours), où nous avons étudié l'influence de différents facteurs (forme et dose de sélénium, voie de contamination, densité d'algues présentes dans le milieu) sur la physiologie des organismes en termes de débit ventilatoire et sur la bioaccumulation du sélénium. Nous avons ainsi caractérisé les comportements ventilatoires des organismes dans nos conditions expérimentales, et évalué la biodisponibilité et la bioaccumulation des différentes formes, par voies directe et trophique.

Ensuite, dans une deuxième partie, nous avons caractérisé l'accumulation du sélénium apporté par voie directe, sous forme inorganique et sous forme organique. Les cinétiques d'accumulation et de dépuración associées au suivi de la répartition du sélénium à différents niveaux d'organisation biologique (organisme entier, organe, subcellulaire) ont été analysées.

Dans une troisième partie nous avons abordé les effets potentiellement toxiques du sélénium aux niveaux moléculaire et cellulaire. Pour les 3 formes de Se, nous avons tout d'abord analysé l'éventuelle apparition de marqueurs de stress oxydant par des mesures biochimiques (par des mesures d'activités enzymatiques du système antioxydant et des dosages de glutathion). Puis, nous avons étudié l'éventuelle toxicité au niveau branchial, par la mesure de l'expression de gènes de certaines protéines et par la mesure d'effet au niveau histologique, en particulier sur l'ultrastructure des cellules branchiales par Microscopie Electronique à Transmission (MET).

2.1.2. Paramètres étudiés

2.1.2.1. *La spéciation*

Hypothèse de travail n°1 : la spéciation du sélénium conditionne sa bioaccumulation et sa toxicité. Dans l'environnement le sélénium existe sous différentes formes chimiques et degrés d'oxydation or, classiquement, la spéciation d'un polluant conditionne sa bioaccumulation et par là même sa toxicité. Ainsi, nous avons étudié 3 formes de sélénium (les 2 formes inorganiques majoritaires dans les eaux de surface, sélénite et séléniate, et une forme organique, la SeMet), correspondant à 3 états d'oxydation (+IV, +VI, -II, respectivement). Nous nous sommes attachés à contrôler la stabilité des états d'oxydation du sélénium au cours des expérimentations.

2.1.2.2. *La ventilation de C. fluminea*

Hypothèse de travail n°2 : la ventilation du bivalve conditionne la bioaccumulation du sélénium. Pour assurer l'homéostasie de son milieu intérieur (en gérant sa prise alimentaire et ses échanges gazeux), le bivalve adapte en permanence son activité de ventilation aux variations de la composition de son environnement (§ 1.2.6). Or, une modification de la ventilation chez les bivalves peut être la cause d'une modification de la bioaccumulation des polluants (Tran *et al.*, 2001; Tran *et al.*, 2002; Tran *et al.*, 2004b). La ventilation contrôle les conditions de renouvellement d'eau au niveau de l'épithélium branchial et donc, le niveau d'exposition des branchies qui est une des principales voies d'entrée de divers contaminants.

Elle n'agit pas directement *via* la quantité de contaminant qui transite dans la cavité branchiale ou palléale car, quel que soit le débit ventilé, la concentration dans la masse d'eau reste en effet constante. En revanche, elle vient modifier au niveau des couches limites, les profils de concentration à l'interface eau-épithélium en modifiant l'épaisseur des couches d'eau peu ou pas renouvelées. La modification des surfaces branchiales ventilées, et donc exposées, est aussi une des conséquences des variations d'activité ventilatoire. L'effet des changements de débits ventilatoires sur la bioaccumulation du sélénium a donc été testé.

Hypothèse de travail n°3 : la ventilation du bivalve est modifiée en présence de sélénium. Le bivalve est capable de modifier son comportement ventilatoire face à l'arrivée d'un composé toxique dissous (§ 1.2.6). Ainsi, nous avons testé l'effet des différentes formes de Se dissous sur la ventilation du bivalve. Le transfert trophique étant important dans le cas du sélénium (§ 1.1.5.3), nous avons également étudié l'impact de l'apport trophique en Se sur la ventilation de *C. fluminea*.

2.1.2.3. La bioaccumulation dans les organes et la répartition subcellulaire

Hypothèse de travail n°4 : la répartition du sélénium est différente selon les formes de Se étudiées. Nous avons analysé les cinétiques de bioaccumulation et de dépuración du sélénium chez *C. fluminea*, à différents niveaux d'organisation biologique (organisme entier, organes, subcellulaire, moléculaire). En effet, la toxicité est gouvernée par l'interaction du polluant avec des cibles biologiques clés, ce processus étant relié aux quantités accumulées et à la part de l'élément détoxiquée ou impliquée de façon critique dans les processus métaboliques. La répartition des polluants dans les différentes fractions subcellulaires (granules, cytosol, pool protéique) peut donc être utilisée comme indicateur de toxicité. Elle peut également apporter des indications sur le transfert aux maillons trophiques supérieurs potentiels. Nous avons donc quantifié la part de Se présente dans différentes fractions subcellulaires obtenues par centrifugation différentielle. Au sein du cytosol, nous avons analysé la répartition du sélénium au niveau des pools protéiques par chromatographie basse pression.

De plus, la localisation du sélénium internalisé dans l'algue et/ou dans les branchies du bivalve, après contamination avec différentes formes chimiques de Se, a été étudiée à l'aide d'un microscope électronique à transmission (MET) couplé à une sonde X.

2.1.2.4. Localisation intracellulaire et analyse ultrastructurale des branchies

Hypothèse de travail n°5 : le sélénium engendre des dommages ultrastructuraux au niveau des cellules branchiales des bivalves. Des effets pathologiques du sélénium ayant été observés sur des tissus de poissons en milieu naturel (§ 1.1.6.3), nous avons voulu tester, en laboratoire, l'effet de différentes formes chimiques de sélénium sur l'ultrastructure des cellules branchiales de *C. fluminea*. Pour cela, des coupes branchiales ont été observées au microscope optique et électronique à transmission (MET).

2.1.2.5. Effet du sélénium au niveau moléculaire

Le sélénium est un élément essentiel (§ 1.1.6.1) qui peut avoir un rôle antioxydant en temps que cofacteur d'enzymes anti-oxydantes. Cependant, il peut rapidement devenir toxique (§ 1.1.6.2). Après pénétration d'un toxique dans la cellule, l'apparition d'un stress oxydant peut générer de la peroxydation lipidique dans la mitochondrie (entraînant le relargage du cytochrome c, puis apoptose), générer des dommages à l'ADN, induire des enzymes du système antioxydant pour lutter contre les radicaux libres et l'apparition de mécanismes de détoxification (métallothionéines).

Hypothèse de travail n°6 : le sélénium peut-être anti-oxydant ou pro-oxydant selon la forme chimique étudiée et modifier ainsi la balance pro-/antioxydante du bivalve. Nous avons analysé les systèmes enzymatiques antioxydants constitués essentiellement de 3 enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), et la glutathion peroxydase (GPx), ainsi qu'un système non enzymatique, le glutathion (GSH).

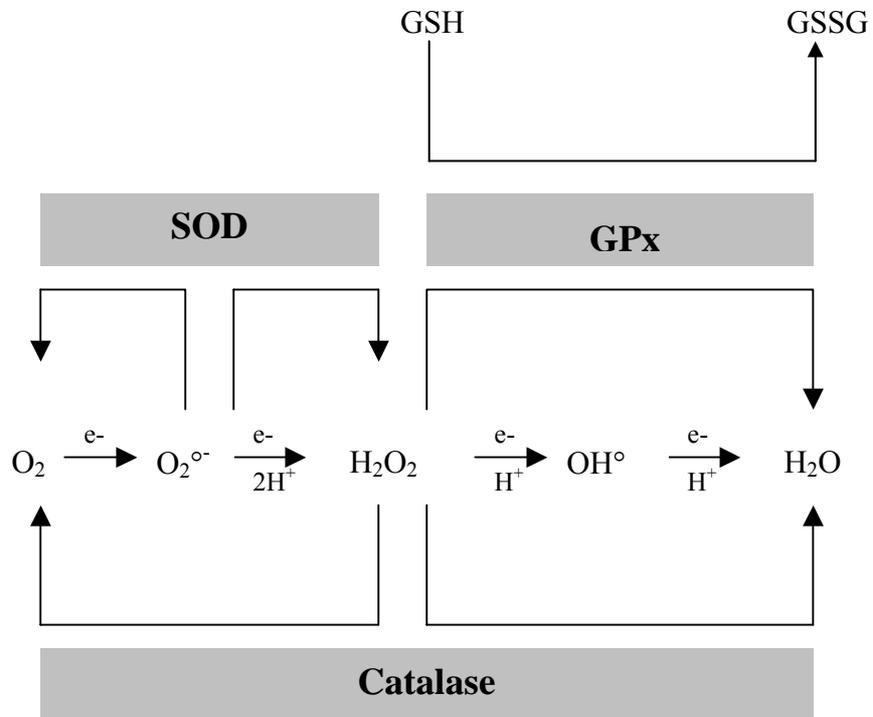
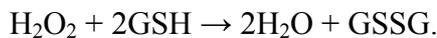


Figure 14 : Schéma représentant les réactions catalysées par les 3 principales enzymes antioxydantes : la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT).

La SOD catalyse la dismutation de deux ions $O_2^{\circ-}$ en peroxyde d'hydrogène à pH neutre : $O_2^{\circ-} + O_2^{\circ-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Trois sortes de SOD ont été identifiées dans la cellule : la SOD à cuivre et à zinc (Cu/ZnSOD) que l'on retrouve dans le cytosol, la Cu/ZnSOD qu'on retrouve au niveau des liquides extracellulaires et la SOD à fer et à manganèse (Fe/MnSOD) qui se trouve dans les mitochondries (Matés et Sánchez-Jiménez, 1999).

La CAT, enzyme confinée dans le cytosol et dans les peroxysomes, accélère la réaction spontanée qui transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) et limite ainsi la formation de radicaux OH° (Matés et Sánchez-Jiménez, 1999). La plupart des cellules aérobies contiennent cette enzyme. Elle est présente à de fortes concentrations dans le foie et dans les globules rouges.

La GPx, enzyme à sélénium présente à la fois dans le cytosol et la mitochondrie, transforme le peroxyde d'hydrogène mais aussi les peroxydes lipidiques. Le peroxyde d'hydrogène et les lipoperoxydes sont réduits en présence de glutathion. Deux molécules de glutathion cèdent deux H au peroxyde d'hydrogène. Les deux glutathions forment une liaison disulfure alors que le peroxyde d'hydrogène donne deux molécules d'eau :



Cette enzyme, par sa dépendance ou non au sélénium, se distingue en deux types. Le type qui est dépendant au sélénium réagit fortement au peroxyde d'hydrogène et aux peroxydes organiques. Le type indépendant au sélénium, par contre, ne réagit que faiblement par rapport aux peroxydes organiques. Il a également d'autres fonctions, dont la principale est la détoxification d'agents cancérogènes.

Le glutathion est le thiol protéique le plus abondant dans les organismes vivants. Il est présent majoritairement à l'état réduit (GSH) dans les cellules et une augmentation de la forme oxydée (GSSG) traduit un stress oxydant. Il agit comme donneur d'électrons permettant de désactiver les espèces réactives comme OH° et les radicaux phénoxy, mais surtout comme substrat des glutathion peroxydases chez les animaux. Il intervient également dans la conjugaison des substances électrophiles (catalysée par des glutathion-transférases) et joue un rôle dans la complexation des métaux intraellulaires.

Hypothèse de travail n°7 : le sélénium peut modifier l'expression de gènes de certaines protéines chez *C. fluminea*. Nous avons étudié l'expression de quatre gènes : celui de la titine (*tit*), métallothionéine 1 (*mt1*), protéine ribosomique S9 (*rpS9*) et cytochrome c oxydase 1 (*cox1*).

Titine. Nous avons dosé l'expression du gène *tit*, car dans la branchie de *C. fluminea*, c'est un gène dont on a observé la surexpression en hypoxie, c'est à dire lorsque la ventilation est profondément stimulée (Achard, en préparation). La titine est une protéine élastique localisée dans le muscle, impliquée dans le contrôle de l'assemblage des protéines sarcomériques et qui régule l'élasticité du sarcomère (Maruyama, 1997). Avec environ 30 000 acides aminés et une masse moléculaire de 3 000 kDa, la titine est la plus grande chaîne polypeptidique connue. Une molécule s'étend de la strie Z à la ligne M, ce qui représente près d'un demi-sarcomère, soit plus d'un micromètre de longueur. La titine est destinée à ramener le sarcomère dans sa position initiale de référence à la suite d'un allongement de celui-ci. Elle sert d'autre part à maintenir le bon alignement de la myosine et de l'actine. Cet élément est particulièrement sollicité pendant les étirements d'un muscle. Des étirements intenses peuvent altérer cet élément. Les étirements peuvent entraîner une contraction en allongement (contraction dite excentrique). Ce travail peut détruire la titine. Après des exercices excentriques on peut avoir une chute de la titine (Cometti, 2003).

Les métallothionéines sont des protéines de faible poids moléculaire avec une forte teneur en Cyst qui jouent un rôle dans le métabolisme normal des cellules (homéostasie du Zn, Cu), dans l'adaptation à différents types de stress (comme le stress oxydant) et dans la détoxification des métaux (Viarengo *et al.*, 2000). Elles sont capables de se lier à de nombreux métaux, essentiels ou toxiques selon le pouvoir thioloprive de ces derniers. Par conséquent elles sont considérées comme des molécules clé pour comprendre les mécanismes physiologiques liés aux métaux, concernant aussi bien la toxication que la détoxification de ceux-ci. La forte réactivité de cette protéine pour échanger des métaux et pour interagir avec d'autres composés électrophiles se basent sur le caractère dynamique de sa structure Cyst-Métaux.

La protéine ribosomique S9 est une protéine constituante de la sous-unité du ribosome. Elle participe, comme toutes les autres protéines constituantes des sous-unités du ribosome, à la bonne organisation et à la stabilisation de l'ARNm. Cet protéine aurait un effet protecteur vis à vis du stress oxydant (Kim *et al.*, 2003). Un rôle dans le processus de réparation SOS lui a également été attribué chez *E. Coli* (Wool, 1996).

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des expériences réalisées.

Forme de Se	[Se] µg·L ⁻¹	Densité d'algues cells·mL ⁻¹	Bioaccumulation et effet sur la ventilation		Bioaccumulation et stress oxydant	Expression de gènes, bioaccumulation à différentes échelles d'intégration, effet sur l'ultrastructure
			Voie directe Exp 1, § 4.1.1	Voie trophique Exp2, § 4.1.2	Voie directe Exp 3, § 4.3.1	Voie directe Exp 4, § 4.2, § 4.3.2, § 4.3.3
Se(+IV)	50	1-2 x 10 ⁵	x		x	x
		3-4 x 10 ⁵	x			
	500	1-2 x 10 ⁵	x			
		3-4 x 10 ⁵	x			
200	1-2 x 10 ⁵		x			
	3-4 x 10 ⁵		x			
Se(+VI)	50	1-2 x 10 ⁵	x			
		3-4 x 10 ⁵	x			
	500	1-2 x 10 ⁵	x			
		3-4 x 10 ⁵	x			
200	1-2 x 10 ⁵		x			
	3-4 x 10 ⁵		x			
SeMet	50	1-2 x 10 ⁵	x		x	x
		3-4 x 10 ⁵	x			
	200	1-2 x 10 ⁵		x		
		3-4 x 10 ⁵		x		
2000	1-2 x 10 ⁵		x			
	3-4 x 10 ⁵		x			

La cytochrome c oxydase est une protéine transmembranaire des mitochondries. Elle est l'accepteur final d'électron au niveau de la chaîne de transfert d'électron. Elle joue un rôle clé dans la phosphorylation oxydative. Elle catalyse le transfert d'électrons des cytochromes c vers l'oxygène moléculaire. Ceci est couplé à un transport actif de protons de part et d'autre de la membrane interne et conduit à l'installation d'une différence de potentiel électrochimique nécessaire à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase (Delbart, 2000). Un stress oxydant pourra entraîner une inhibition de la respiration *via* une inhibition de la COX.

Un récapitulatif de l'ensemble des expériences est présenté dans le Tableau 7.

2.1.3. Articulation du mémoire

Après la présentation des matériels et méthodes utilisés (chapitre 3), l'ensemble des résultats et discussion sera présenté sous formes d'articles et/ou paragraphes :

➤ **Bioaccumulation du sélénium chez *C. fluminea* : rôle de la ventilation du bivalve et de la Spéciation du sélénium** (§ 4.1)

- Bioaccumulation du sélénium par la voie directe : Effet de la ventilation du bivalve et de la spéciation du sélénium (§ 4.1.1).

Fournier E., Adam C., Massabuau J.C., Garnier-Laplace J. 2005. Bioaccumulation of waterborne selenium by the freshwater bivalve *C. fluminea* : influence of feeding induced ventilatory activity and selenium species. *Aquatic Toxicology* 72/3 : 251-260.

- Bioaccumulation du sélénium par la voie trophique : Effet de la ventilation du bivalve et de la spéciation du sélénium (§ 4.1.2).

Fournier E., Adam C., Massabuau J.C., Garnier-Laplace J. 2005. Selenium bioaccumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* and transfer to *Corbicula fluminea* : Role of speciation and bivalve's ventilation. *Soumise à Environ Toxicol and Chem*.

- Comparaison de la bioaccumulation du sélénium par la voie directe et par la voie trophique (§ 4.1.3).

Fournier E., Adam C., Massabuau J.C., Garnier-Laplace J. 2005 Effect of selenium exposure on the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*. *Radioprotection-colloques* 40 :S3-S9.

- Principales avancées et conclusions du chapitre (§ 4.1.4)

- **Bioaccumulation du sélénium à différents niveaux d'organisation biologique chez *C. fluminea* (§ 4.2)**

- **Toxicité subcellulaire du sélénium (§ 4.3)**
 - Suivi du statut anti-oxydant de *C. fluminea* lors d'une exposition au Se (§ 4.3.1)
 - Effet du sélénium sur l'expression de gènes (§ 4.3.2).
 - Effet d'une exposition au Se sur l'ultrastructure des cellules branchiales de *C. fluminea* (§ 4.3.3).
 - Principales avancées et conclusions du chapitre (§ 4.3.4).

Tableau 8 : Composition ionique de l'eau du réseau, de l'eau artificielle, du milieu HSM et des eaux douces mondiales.

Ions majeurs (mmol·L ⁻¹)	Eau du réseau	Eau artificielle	Moyenne mondiale*
Ca ²⁺	1.70	0.290	0.335
Mg ²⁺	0.53	0.195	0.138
Na ⁺	0.43	0.500	0.223
K ⁺	0.028	0.160	0.033
Cl ⁻	0.6	0.900	0.161
SO ₄ ²⁻	1.96	0.100	0.171
NO ₃ ⁻	0.024	0.500	0.017
PO ₄ ³⁻	-	0.005	-
HCO ₃ ⁻	2.38	0.025	0.852

* (Meybeck, 1981)

Ions majeurs (mmol·L ⁻¹)	Milieu HSM**
NH ₄ ⁺	9.350
Cl ⁻	9.490
K ⁺	22.00
PO ₄ ³⁻	13.700
HCO ₃ ⁻	Atm
NO ₃ ⁻	-
SO ₄ ²⁻	0.081
Mg ²⁺	0.081
Ca ²⁺	0.068
Na ⁺	0.102
BO ₃ ⁻	3.01·10 ⁻³
Mn ²⁺	2.10·10 ⁻³
EDTA	0.806·10 ⁻³
Fe ²⁺	0.592·10 ⁻³
MoO ₄ ²⁻	3·10 ⁻⁵
Zn ²⁺	2.43·10 ⁻⁵
Co	1.09·10 ⁻⁵
Cu ²⁺	7.04·10 ⁻⁸

** (Macfie *et al.*, 1994).

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Conditions expérimentales

3.1.1. Origine et maintenance des organismes

Les bivalves ont été recueillis sur des sites non contaminés dans le sud-ouest de la France (St Seurin, en Dordogne et Fontet, en Gironde). Ils ont été prélevés manuellement et transportés à sec, en glacière, jusqu'au laboratoire. Ils ont ensuite été mis en stabulation dans de l'eau du réseau déchlorée au moins un mois avant toute expérimentation (densité ≤ 5 individus par litre). Ils étaient nourris chaque jour avec une suspension d'algues vertes unicellulaires *Chlamydomonas reinhardtii* (2×10^5 cells·mL⁻¹ dans l'aquarium après ajout).

La souche d'algue (*Chlamydomonas reinhardtii* 11/32B) a été obtenue auprès de « Culture Collection of Algae and Protozoa » (CCAP ; Cumbria, United Kingdom). Les algues ont été cultivées dans un milieu inorganique : le milieu HSM « High Salt Medium » (Harris, 1988) dans des erlenmeyers en verre de 2 L sous une luminosité de 100 ± 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Sa composition est indiquée dans le Tableau 8.

3.1.2. Choix du milieu d'exposition

Les expériences aussi bien sur algues que bivalves ont été réalisées dans une eau artificielle de composition ionique proche de la moyenne des eaux douces mondiales (pH 7 à l'équilibre) et adaptée à la physiologie des organismes bivalves. Sa composition est indiquée dans le Tableau 8. Le pH était ajusté à la valeur voulue à l'aide de NaOH à 0.1 M et/ou HCl à 0.1 M.

3.1.3. Dispositif expérimental

Toutes les expérimentations ont été réalisées sur table antivibratoire afin d'amortir au mieux les vibrations susceptibles de modifier le comportement des bivalves. La photopériode utilisée a systématiquement été de 14 h : 10 h (jour : nuit) avec une lumière artificielle procurée par un néon à une intensité de 4.0 ± 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Les aquariums étaient placés dans un bain-marie afin de maintenir une température de 20 °C.

Système ouvert
(renouvellement continu, 5 fois le volume total / jour)

Suivis et régulations :
pH 7.00 ± 0.05
Température 20 ± 0.5 °C
Densité d'algues
Concentrations et formes de Se

Paramètres étudiés :
Débit ventilatoire
Bioaccumulation

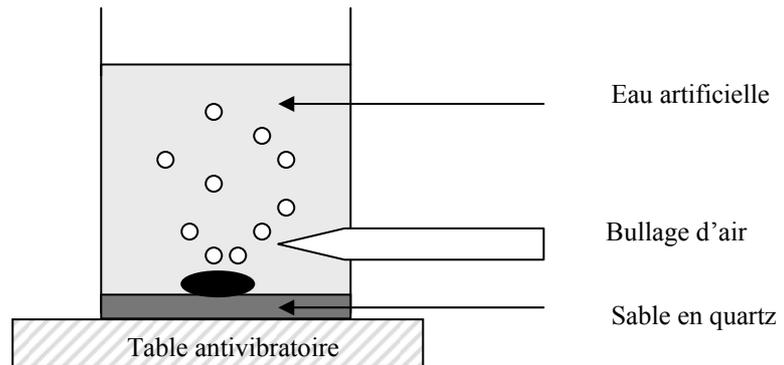


Figure 15 : Schéma des unités expérimentales utilisées pour les expériences de court terme avec mesure du débit ventilatoire (Exp 1 et Exp 2, § 4.1).

Système semi-ouvert
(renouvellement manuel, la moitié du volume total / jour)

Suivis et régulations :
pH 7.00 ± 0.05
Température 20 ± 0.5 °C
Densité d'algues
Concentrations et formes de Se

Paramètres étudiés :
Bioaccumulation
Toxicité

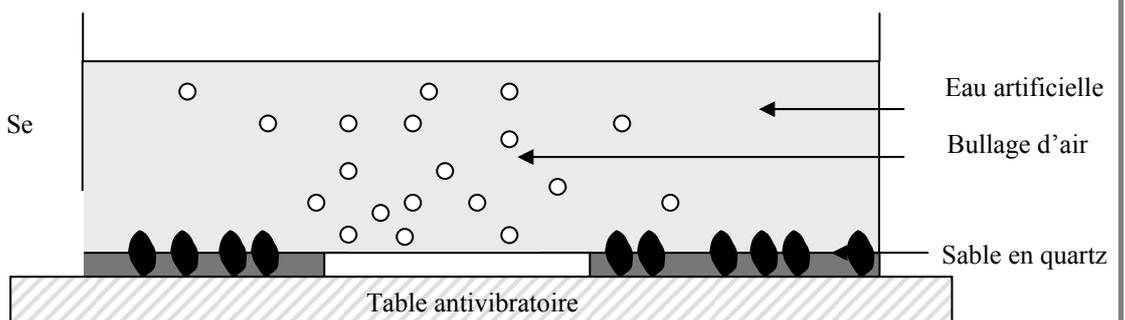


Figure 16 : Schéma des unités expérimentales utilisées pour les expériences de long terme (Exp 3 et Exp 4 ; § 4.2 et § 4.3).

Pour limiter les phénomènes d'adsorption des contaminants sur les parois des bacs, le matériau utilisé était du polypropylène pour le sélénium inorganique et du verre pour le sélénium organique.

Deux types d'unités expérimentales ont été utilisés :

- Pour les expériences sur la ventilation, de durée 3 jours (Exp 1 et Exp 2 ; § 4.1), nous avons travaillé sur des petites unités de 150 mL contenant un seul bivalve (Figure 15). Les expériences ont alors été réalisées en système ouvert avec un renouvellement d'eau en continu (5 fois par jour) afin de permettre une composition ionique constante et un apport d'algues suffisant. Chaque béccher était alimenté par une nourrice (contenant le milieu frais et les algues) au niveau de laquelle se faisait la régulation de pH à l'aide d'un pHstat (Consort R301, Illkirch, Belgium). Les unités expérimentales sont schématisées dans la Figure 15 où les principaux paramètres contrôlés sont indiqués.

- Pour les autres expériences, de durée comprise entre 10 et 70 jours (Exp 3 et Exp 4 ; § 4.2 et § 4.3), les unités expérimentales contenaient 10 L, pouvant contenir jusqu'à 100 bivalves (Figure 16). Le renouvellement d'eau était fait manuellement (la moitié du volume total par jour), à l'aide de pompes à vide. L'apport d'algues se faisait par ajouts ponctuels au cours de la journée.

Les organismes ont systématiquement été acclimatés 7 jours aux conditions et dispositifs expérimentaux (température, pH, photopériode, luminosité) avant exposition.

3.1.4. Voies de contamination

Nous avons testé les 2 voies de contamination existant chez les modèles aquatiques : directe, par une contamination de la colonne d'eau et trophique, par une pré-contamination de la nourriture.

- La voie directe (Exp 1, Exp 3 et Exp 4, ; § 4.1.1, 4.2 et 4.3)

La contamination des aquariums s'est faite par la colonne d'eau par des ajouts de Se à partir des solutions mères de sélénite (Na_2SeO_3), séléniate (Na_2SeO_4) ou séléno-L-méthionine ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Se}$) à $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (SIGMA Aldrich, Steinheim, Germany). Pour les expériences visant à déterminer la distribution cytosolique par chromatographie basse pression (§ 4.2), le sélénite a été marqué avec du ^{75}Se (Annexe 1) pour augmenter la sensibilité de la détection (la scintillation liquide permettant une sensibilité plus importante que la génération d'hydrures, § 3.3)

- La voie trophique (§ 4.1.2)

Les algues ont été pré-exposées 1h à différentes concentrations de sélénite, séléniate et SeMet. Elles ont été collectées par centrifugation et distribuées aux bivalves en continu.

3.2. Mesure du débit ventilatoire

La mesure du débit ventilatoire a été basée sur une analyse de la décroissance des algues, dans un système clos en un temps fixé. Des contrôles ont été effectués sans bivalve afin de mesurer la décroissance éventuelle d'algues liée à des problèmes de sédimentation. La densité d'algues a été mesurée à l'aide d'un compteur de particules (Beckman Coulter, Roissy, France).

Nous avons appliqué la formule de Jorgensen (Coughlan, 1969) pour calculer le débit ventilatoire :

$$\dot{V}_w = V \cdot \frac{[(\ln XO - \ln Xt) - (\ln X'O - \ln X't)]}{t \cdot m}$$

Où \dot{V}_w est le débit ventilatoire ($\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ p.f.)

V est le volume de chaque chambre de mesure (mL)

XO est la densité d'algue en temps zéro (algues $\cdot\text{mL}^{-1}$)

Xt est la densité d'algues au temps final (algues $\cdot\text{mL}^{-1}$)

$X'O$ est la densité d'algues au temps zéro dans le témoin, sans bivalve (algues $\cdot\text{mL}^{-1}$)

$X't$ est la densité d'algues au temps final dans le témoin, sans bivalve (algues $\cdot\text{mL}^{-1}$)

t est le temps de la mesure (h)

m est la masse de tissus frais (g)

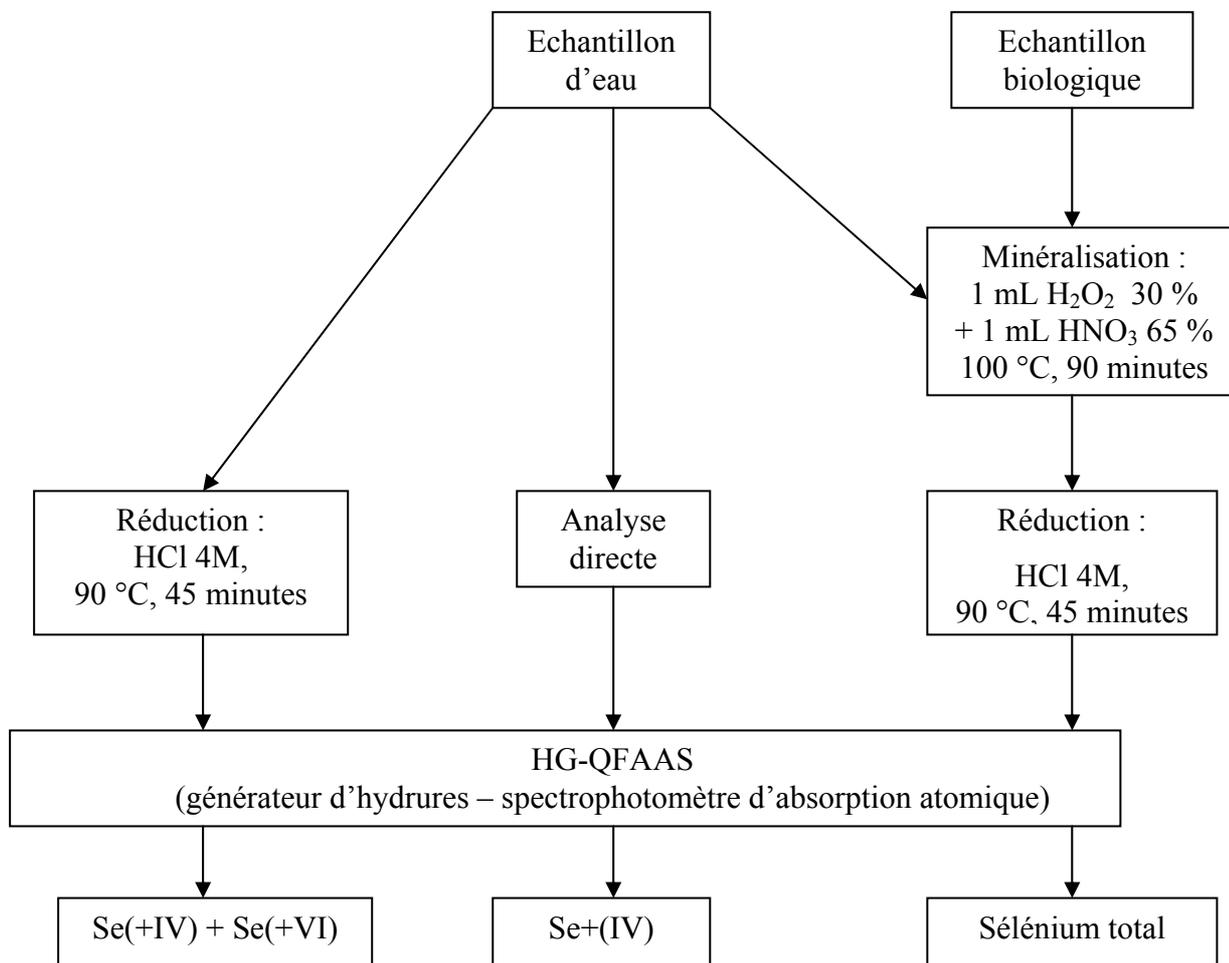


Figure 17 : Methode d'analyse du sélénium par HG-QFAAS

Pour appliquer cette formule 4 hypothèses sont posées :

- la diminution de la concentration d'algues est uniquement due à la filtration de l'animal
- le débit ventilatoire est constant au cours du temps
- les algues sont retenues par le bivalve avec une efficacité égale ou proche de 100 %
- les algues sont réparties de façon homogène dans le milieu.

3.3. Méthodes d'analyses du sélénium

3.3.1. Dosage du sélénium stable

3.3.1.1. Dosage par absorption atomique HG-QFAAS

Les échantillons contenant du sélénium (eaux et tissus biologiques) ont systématiquement été dosés à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique couplé à un générateur d'hydrures (FIAS-100 / AAS 4110-ZL Perkin, CT USA). Cette technique est relativement sensible ($0.04 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et permet d'évaluer, indirectement, la part de sélénite et de séléniate dans un échantillon d'eau.

Cette technique est spécifique au dosage du sélénite, seule forme capable de générer des hydrures quantitativement. Le dosage des différentes formes de sélénium a donc nécessité des étapes préliminaires de minéralisation et/ou réduction, afin de les transformer en sélénite (Figure 17). Pour déterminer la concentration de séléniate dissous, une étape de pré-réduction du séléniate $\text{Se}(+\text{VI})$ en sélénite $\text{Se}(+\text{IV})$ est nécessaire. Elle est réalisée dans du HCl à 4 M chauffé pendant 45 minutes à 90°C . Des tubes fermés sont utilisés. La concentration en séléniate est déterminée en faisant la différence entre $[\text{Se}(+\text{IV}) + \text{Se}(+\text{VI})]$ et $[\text{Se}(+\text{IV})]$. Pour déterminer la concentration totale en Se dans les échantillons biologiques ou bien dans des échantillons naturels contaminés en Se, la destruction de la matrice de l'échantillon est nécessaire pour pouvoir analyser l'échantillon.

L'échantillon biologique est minéralisé à l'aide d'un mélange $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ (v/v 1 : 1) et chauffé à 100 °C pendant 90 minutes en système fermé pour éviter toute perte par volatilisation. Cette procédure d'oxydation conduit à un mélange d'états d'oxydation (+IV) et (+VI). Ainsi, la réduction du Se(+VI) en Se(+IV) doit être effectuée comme expliqué précédemment. La technique de préparation des échantillons et en particulier les quantités d' HNO_3 et H_2O_2 à ajouter pour la minéralisation ont été optimisées pour chaque matrice (mise au point du dosage, voir Annexe 2).

Le principe du dosage est le suivant :

- L'échantillon aqueux (sélénite) est introduit avec du HCl (10 % v/v) au niveau du générateur d'hydrures. Puis, un agent réducteur (NaBH_4) est ajouté et des hydrures de Se sont formés (SeH_2) à partir du sélénite.
- Les hydrures volatiles sont transportés par un gaz vecteur (argon) à l'intérieur d'une cellule en quartz (chauffée électriquement à 1000 °C) où ils sont atomisés.
- L'absorbance est mesurée à 196.0 nm à l'aide du spectromètre d'absorption atomique équipé d'une lampe EDL (*Electrodeless Discharge Lamp*). Un intégrateur permet l'enregistrement et le traitement du signal apporté par le sélénium.

L'appareil était étalonné à l'aide de solutions de sélénium à $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, préparées à partir de sels de Na_2SeO_3 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). De la poudre de foie d'aiguillat, *Squalus acanthias*, était utilisée comme matériel de référence certifié (DOLT3-3, NRC-CNRC, Canada) pour le dosage du sélénium.

3.3.1.2. Dosage par ICP-AES

Cette méthode a été utilisée de façon ponctuelle pour mesurer les concentrations en Se total dans les échantillons d'eau. Elle permet d'obtenir des résultats plus rapidement que par HG-QFAAS, cependant, l'appareil ne donne que les concentrations en Se total (limite de détection $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Nous avons utilisé cette technique de dosage pour le suivi des concentrations en Se en continu pendant les expérimentations, afin de pouvoir ajuster les concentrations par ajouts ponctuels. Les échantillons biologiques peuvent également être mesurés par cette technique après minéralisation ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ 90 minutes à 100 °C).

La méthode de dosage par ICP-AES (Spectrométrie d'Emission Atomique – Source Plasma à couplage inductif) consiste à exciter les éléments à l'aide d'un plasma (gaz partiellement ionisé et macroscopiquement neutre) atteignant la température de 8000 K. A cette température, tout élément est excité et pour revenir à un état stable, émet des photons à des longueurs d'onde caractéristiques. La mesure se décompose en plusieurs étapes. L'échantillon introduit sous forme liquide (dans 2 % HNO₃), est transformé en aérosol par nébulisation pneumatique. L'aérosol est alors transporté dans le plasma d'argon où les éléments sont atomisés et ionisés. Le retour à un état d'énergie stable s'accompagne de l'émission de radiations à des longueurs d'ondes caractéristiques de chaque élément (196 nm pour Se), dispersées par un monochromateur puis analysées par un détecteur photométrique.

3.3.2. Dosage du ⁷⁵Se

3.3.2.1. Préparation des échantillons

Pour l'analyse des échantillons d'eau nous avons prélevé 1 mL dans la colonne d'eau que nous avons mis dans des flacons en verre (20 mL) avec 19 mL de liquide à scintillation (Instagel, Packard Instrument, Rungis, France).

Pour la détermination de l'activité dans les échantillons biologiques, le dosage a été précédé d'une étape de minéralisation des échantillons (H₂O₂/HNO₃, 90 minutes, 100 °C) en système fermé. Puis, comme précédemment, 1 mL d'échantillon a été conditionné dans 19 mL de liquide à scintillation dans des tubes en verre pour le comptage.

Les activités en ⁷⁵Se ont été mesurées par comptage en scintillation liquide β (Quantulus 1220, Wallac Oy, Turku, Finland), pour lequel la limite de détection est de 40 mBq.

3.3.2.2. Principe du dosage

L'énergie cinétique de la particule radioactive est convertie par le liquide scintillant en une émission de lumière (photons) susceptible d'être détectée par un photomultiplicateur. Ce dernier convertit ensuite les photons en électrons. Le nombre de ces électrons primaires est amplifié pour former un flux d'électrons recueilli sur une électrode polarisée par application d'une haute tension. La variation de la tension consécutive à la collection de ce flux d'électrons est proportionnelle à l'énergie de la particule β à l'origine du phénomène.

Le cumul de ces événements permet de former un spectre représentatif de l'énergie des particules détectées. La fenêtre utilisée allait de 5 à 660 KeV, englobant ainsi l'ensemble des énergies liées à l'émission des électrons Auger pour le radioisotope ⁷⁵Se. Le temps de comptage a été adapté en fonction de l'activité des échantillons (de quelques minutes à une heure) afin d'obtenir une erreur acceptable (< 5%). La conversion des coups par minute (CPM) en désintégrations par minute (DPM) a été faite en divisant les CPM par l'efficacité (E %) du détecteur. Celle-ci varie avec le niveau de quenching correspondant à un effet de la matrice, mesuré par l'appareil pour chaque échantillon. Les DPM sont ensuite converties en Becquerels (1 Bq = 60 DPM).

3.4. Dosages biochimiques

3.4.1. Protocoles de préparations des fractions S9 pour le dosage des biomarqueurs

Les méthodes de préparation des animaux pour le dosage du glutathion sont particulières et incompatibles avec le dosage des activités enzymatiques, ainsi les mesures ont été faites sur des individus différents.

3.4.1.1. Préparation de la fraction S9 en vue des dosages enzymatiques

Les animaux entiers ont été pesés et 3 volumes (mL) de Tris (100 mM, pH 7.5) pour 1 volume (g) de tissu ont été ajoutés. Ils ont ensuite été broyés dans ce tampon à l'aide d'un potter pendant 1 minute à une vitesse de 800 tours·min⁻¹. Après broyage, l'homogénat était centrifugé à 9 000 g pendant 30 minutes, à 4 °C.

Le surnageant était récupéré et homogénéisé (à l'aide d'une pipette en prélevant puis rejetant plusieurs fois le cytosol) puis aliquoté dans des eppendorfs placés aussitôt à 4 °C destinés à être congelés à - 80 °C (l'opération est réalisée à 4 °C jusqu'à la congélation).

3.4.1.2. Préparation de la fraction « S9 acide » en vue du dosage du glutathion

Le dosage du glutathion nécessite de précipiter les grosses protéines qui pourraient interférer sur la mesure. La fraction S9 était donc préparée de la même façon que celle décrite dans le paragraphe précédent mais dans un tampon phosphate acide (tampon phosphate 100 mM, EDTA 5 mM, TCA 5 %). Chaque fraction S9 était diluée au moins par 2 avant tout dosage pour éviter l'effet matrice.

3.4.2. Protocole de dosage des activités enzymatiques

(dosages de la CAT, SOD et GP_x réalisés par la société Bio-Tox, Villenave d'Ornon)

3.4.2.1. Teneurs en protéines

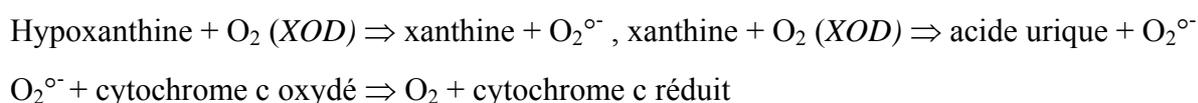
Le taux de protéines totales dans les fractions S9 a été déterminé par une méthode colorimétrique (Lowry *et al.*, 1951) adaptée au lecteur de microplaque BIO-TEK Synergy HT. Cette technique combine la réaction du Biuret avec l'action d'un réactif mercapturique des phénols, le réactif de Folin : on dose à la fois la liaison peptidique et les chaînes de tyrosine. La sensibilité est de 10 à 100 µg·ml⁻¹. Une gamme étalon était réalisée avec de l'albumine sérique de bovin.

3.4.2.2. Activité Catalase (CAT)

Le dosage de l'activité CAT est réalisé au spectrophotomètre KONTRON UVIKON 932 selon la méthode de Saint Denis *et al.* (1998) adaptée de Clairborne, (1985). On mesure la disparition de HOOH.

3.4.2.3. *Activité superoxyde dismutase (SOD)*

Le dosage est réalisé au spectrophotomètre KONTRON UVIKON 932 selon la méthode adaptée de McCord et Fridovich (1969). On emploie la xanthine oxydase (XOD) qui engendre du superoxyde en continu en présence d'hypoxanthine. Le superoxyde agit à son tour en réduisant le cytochrome C.



Cette réduction du cytochrome c est inhibée en présence de SOD qui détruit le superoxyde. La réduction maximale du cytochrome C est mesurée sans échantillon. L'échantillon est ensuite ajouté de façon à diminuer cette réaction de 50 %. Une courbe standard de SOD permet d'en déduire l'activité superoxyde dismutase.

3.4.2.4. *Activité Glutathion peroxydase (GPx)*

Le dosage de l'activité GPx est réalisé au spectrophotomètre KONTRON UVIKON 932 selon la méthode de Greenwald (1985). On mesure la disparition du NADPH, couplée à l'oxydation du glutathion :



3.4.2.5. *Protocole de dosage du glutathion total et oxydé*

(protocoles développés pendant la thèse)

Le dosage des différentes formes est basé sur la réaction entre le groupement –SH du glutathion et de DTNB (dithiobisnitrobenzoate). En effet, le groupement –SH réduit le DTNB en TNB (thionitrobenzoate), coloré en jaune, possédant une absorbance importante à 412-415 nm.

Ainsi, en présence de glutathion réduit (GSH), le DTNB est transformé en un composé (TNB) détectable à 412 nm, et c'est l'apparition de ce produit que l'on a suivi pour quantifier le glutathion dans nos échantillons. L'utilisation de la glutathion réductase permet de transformer le GSSG en GSH. On observe alors des cinétiques de formation de TNB proportionnelles à la quantité de glutathion total présent dans le milieu. La dérivation préalable du GSH par le 2-VP permet de ne doser que le GSSG sous l'action de la glutathion réductase.

3.5. Expression de gènes

Nous avons utilisé le Light cycler (Roche) qui est un thermocycleur rapide couplé à un microspectrofluorimètre. Il est relié à un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel des données ainsi que leur traitement.

Après extraction des ARNm, une étape de reverse transcription de ces ARNm a permis l'obtention d'ADNc. Puis, l'amplification de fragments d'ADN spécifiques, à l'aide de couples d'amorces encadrant la région cible, a été réalisée par PCR. L'évolution de l'amplification est représentée par une courbe d'allure sigmoïdale. La première phase correspond à une amplification exponentielle où la quantité de produits de PCR obtenue est directement fonction du nombre de copies initialement présentes. Au cours de cette étape de PCR, l'incorporation d'un fluorophore (SYBR GREEN) permet la quantification de produits d'amplification néoformés. Par analyse, il est ensuite possible de déterminer le taux d'ARNm initialement présents dans l'échantillon. Afin de standardiser et normaliser les différentes analyses, il a été réalisé en parallèle, la quantification d'un ARNm endogène ubiquitaire (28S). Ce gène dit de référence, permet de comparer les résultats d'une PCR à l'autre et de pouvoir déterminer l'expression de plusieurs gènes dans un échantillon par rapport à leur expression dans un autre échantillon. Nous avons opté pour la quantification absolue de nos gènes, ainsi une gamme étalon a été réalisée à l'aide d'ADN d'un gène (la métallothionéine de *Crassostrea gigas*) dont nous connaissons la quantité.

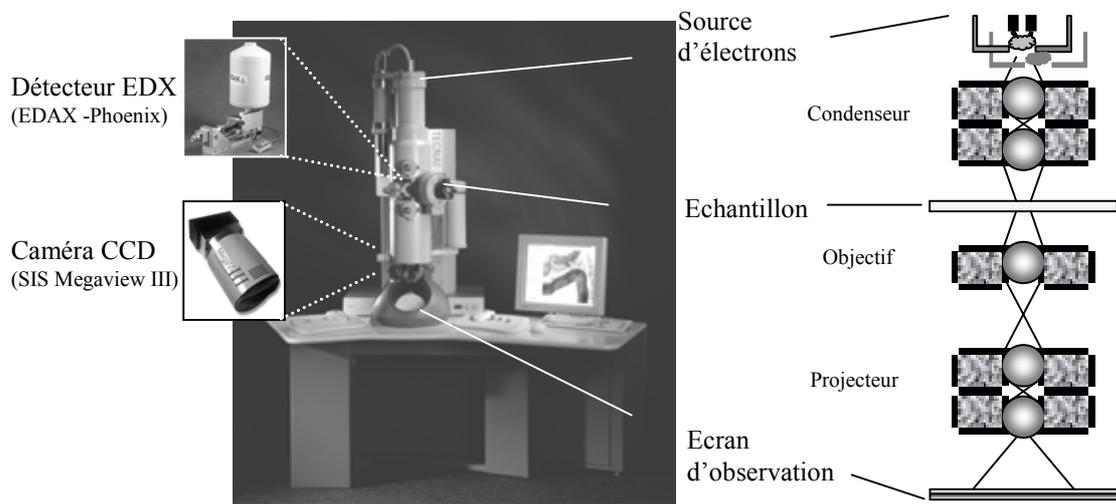


Figure 18 : Schéma du Microscope Electronique à Transmission Tenai 12 G² Biotwin.

3.6. Le Microscope Electronique à Transmission (MET) et la spectrométrie par dispersion d'énergie (EDS)

3.6.1. Appareillage

La microscopie électronique est une technique qui permet de visualiser des structures grâce à des appareils dont la source de rayonnement émet des électrons. La résolution d'un microscope électronique à transmission est bien supérieure à celle que l'on peut atteindre avec des photons (microscope optique traditionnel). Nous avons utilisé le microscope Tecnai 12 G² Biotwin (FEI, Eindhoven, Pays-Bas), ayant une tension d'accélération maximale de 120 kV, une résolution de 0.2 nm, et un grossissement possible de 390 à 300 000 fois.

Le Microscope Electronique à Transmission donne accès à des échelles d'observations submicrométriques et permet l'analyse d'éléments en très faible quantité ou localisés sur des zones très petites (échelle cellulaire ou subcellulaire) par microanalyse des rayons X. Ainsi, un détecteur EDS, équipé d'une fenêtre ultra-fine (SUTW, modèle SAPPHIR) est couplé au microscope. Cette technique permet de visualiser le sélénium s'il représente au moins 1 % de tous les autres éléments présents.

3.6.2. Préparation des échantillons

Après dissection, les tissus de *C. fluminea* ont immédiatement été fixés dans un mélange osmotiquement et ioniquement équilibré (glutaraldéhyde 4 % dans du tampon cacodylate à pH 7.4), permettant de conserver, sans modification, les structures correspondant à l'état vivant. Les tissus ont ainsi été fixés pendant 2 jours. Après plusieurs lavages successifs, les échantillons ont été osmiés par trempage d'1 h dans du tétraoxyde d'osmium (1 % dans du tampon cacodylate à pH 7.4) afin d'augmenter le contraste.

Avant d'inclure les échantillons biologiques dans des résines non hydrosolubles, ils ont été déshydratés par des bains successifs d'alcool éthylique de concentrations croissantes.

L'inclusion a été faite dans des mélanges de résines fluides (EPON 812) qui durcissent après polymérisation.

Le bloc de résine a ensuite été taillé en tronc de pyramide à l'aide d'une machine à dresser les blocs (LEICA). Les coupes ont été effectuées avec un ultramicrotome (LEICA) muni d'un couteau de diamant qui permet des coupes ultra-fines (100 nm). Elles ont ensuite été déposées sur des grilles de cuivre d'un diamètre de 3.5 mm.

3.7. Fractionnement subcellulaire et chromatographie **basse pression**

3.7.1. Préparation des fractions subcellulaires

Les bivalves ont été disséqués et les tissus (branchies et masse viscérale) pesés. Ensuite, les tissus ont été finement découpés à l'aide d'un scalpel pour permettre un broyage plus efficace. Les petits morceaux ont été mis dans un potter en verre de 2 mL avec 1 mL de tampon Tris contenant du pepabloc (inhibiteur de protéases), du NaN₃ (antibactérien) et du DTT (anti-oxydant). L'homogénéisation s'est faite avec un potter pendant 3 minutes à 2000 tr·min⁻¹. Toutes les étapes s'effectuaient à 4 °C. Le tube en verre était rincé avec du tampon pour récupérer la totalité du broyat qui était ensuite placé dans un tube à centrifugation (volume total de 4 mL). Différents protocoles de centrifugations ont été suivis en fonction des fractionnements souhaités.

3.7.1.1. Fractionnement subcellulaire

Le fractionnement subcellulaire des homogénats a été réalisé par centrifugation différentielle (Paquet, 1993), optimisée pour *C. fluminea*. Une première centrifugation à 900 g pendant 10 minutes permet de récupérer un premier culot (C1) contenant les noyaux, débris et granules. Le surnageant (S1) est alors centrifugé une deuxième fois à 12 000 g pendant 15 minutes et permet de récupérer un deuxième culot (C2) contenant mitochondries et lysosomes. Le surnageant (S2) est ensuite centrifugé 30 minutes à 45 000 g et permet d'obtenir un troisième culot (C3) composé de membranes. Enfin, le surnageant (S3) est centrifugé à 100 000 g pendant 90 minutes afin de récupérer un dernier culot (C4) contenant les microsomes et le surnageant (S4) représentant le cytosol. Des observations par microscopie optique et électronique à transmission ont permis de vérifier que les fractions isolées étaient majoritairement constituées des organites attendus (Camilleri *et al.*, 2004).

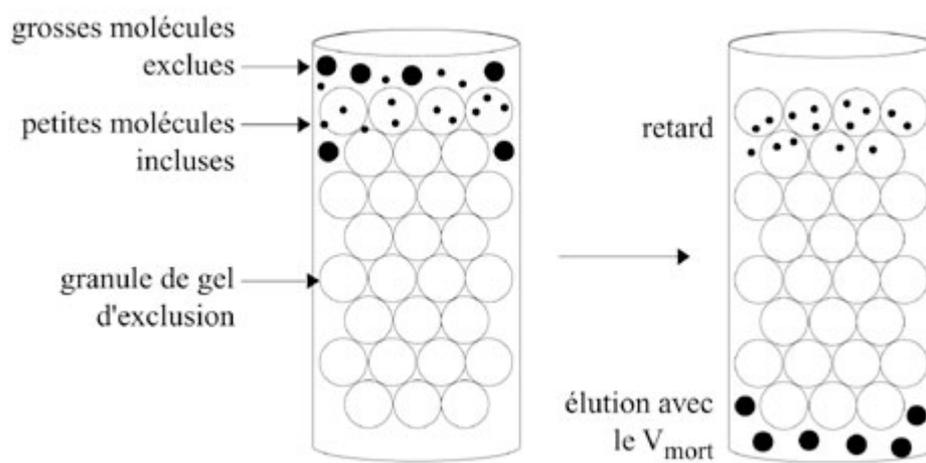


Figure 19 : Schéma du tamisage moléculaire

3.7.1.2. Séparation des fractions soluble (cytosol) et insoluble

Cette technique a été utilisée pour récupérer rapidement la fraction cytosolique afin d'analyser la part de Se dans cette fraction et dans les différents groupes protéiques qui la composent. Elle se fait en 2 centrifugations. Une première centrifugation se fait à 45 000 g pendant 40 minutes à 4 °C. Le surnageant obtenu est centrifugé une deuxième fois pendant 1h à 100 000 g . Le surnageant final représente la fraction cytosolique. Sur les 4 mL de surnageant obtenus :

- 1 mL seront prélevés pour estimer la part de Se dans la fraction « cytosol » par HG-QFAAS ou scintillation liquide,
- 2 mL seront prélevés pour le passage sur la colonne de la chromatographie basse pression.

Les 2 culots sont minéralisés ensemble pour estimer la part de Se dans la fraction insoluble.

3.7.2. La chromatographie d'exclusion stérique

3.7.2.1. *Principe et appareillage*

La chromatographie d'exclusion stérique appelée aussi filtration sur gel permet de séparer les molécules en fonction de leur poids moléculaire. Cette technique est utilisée pour des molécules de gros poids comme les protéines. La phase mobile est liquide tandis que la phase stationnaire est composée de perles poreuses non absorbantes. Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, au niveau du volume mort (V_m). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. Il existe une relation linéaire entre le volume d'élué et le logarithme de la masse moléculaire. Le début de l'analyse est déterminé par le volume mort de la colonne et la fin de l'analyse par le volume total (V_t) de la colonne utilisée.

Tableau 9 : Poids moléculaire des protéines utilisées pour l'étalonnage de la colonne

Protéines étalon	Poids moléculaire
Le bleu dextran	1000 kDa
La ferritine	438 kDa
La catalase	240 kDa
L'albumine	67 kDa
L'ovalbumine	49 kDa
La chymotrypsinogen	20 kDa
La ribonucléase	16 kDa

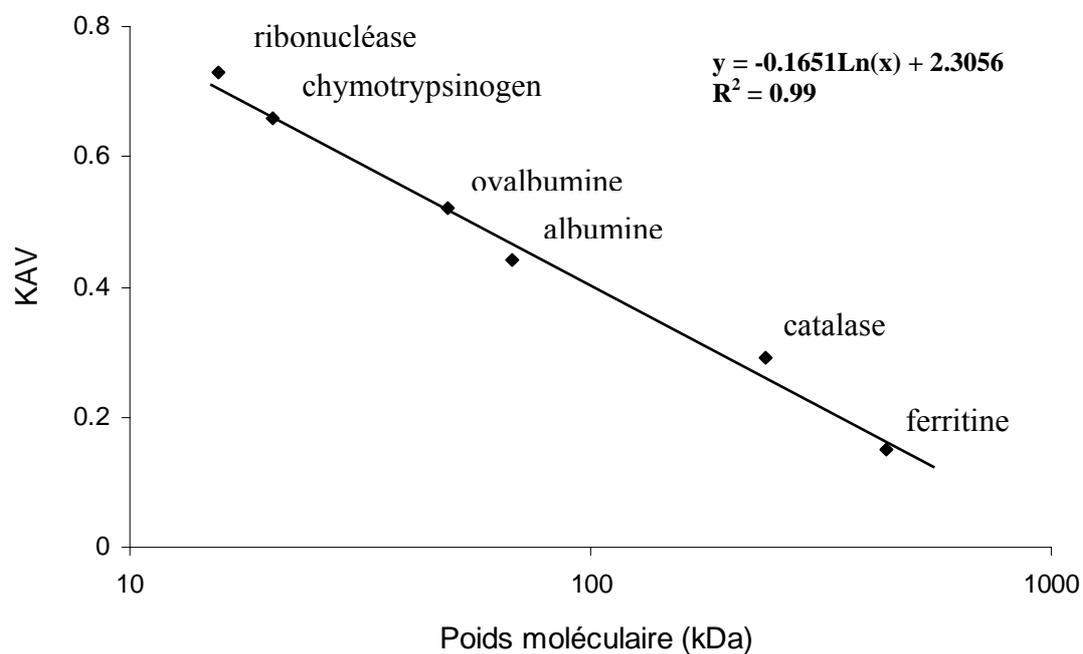


Figure 20 : Droite d'étalonnage de la colonne d'exclusion stérique.

La colonne utilisée est une 200 Hiloal 16/60 (Amersham Pharmacia Biotech), remplie d'un gel superdex d'un volume total de 120 mL. Elle permet de séparer des protéines de poids moléculaire compris entre 10 et 600 kDa, toutefois, les protéines de poids moléculaires supérieur à 600 kDa vont toutes être éluées dans le volume mort et celle de plus petit poids que 10 kDa vont être éluées en fin d'analyse. Un détecteur permet de mesurer l'absorbance à 280 nm. Il est directement relié à un enregistreur REC 111 (Amersham) qui permet l'obtention d'un chromatogramme.

3.7.2.2. *Etalonnage et injection des échantillons de cytosol*

Une gamme étalon a été réalisée à l'aide d'un kit de gel filtration (Amersham 17-0441-01) qui contient six protéines de poids moléculaire différents et du bleu dextran (Tableau 9). Le Bleu dextran permet de calculer le volume mort de la colonne car son poids moléculaire (1000 kDa) est au-dessus des capacités de la colonne. Les injections ont été faites avec une boucle de 0.5 mL, un débit de 1 mL·min⁻¹ et une détection UV de 0.5 AUFS. Le Bleu dextran est injecté seul, les autres protéines sont injectées deux par deux pour des raisons de pouvoir séparateur de la colonne. Le volume d'éluion (V_e) de chaque protéine est mesuré sur le chromatogramme du début d'injection au centre du pic d'éluion. Les résultats des chromatogrammes permettent de tracer une droite d'étalonnage, représentant le coefficient de partage entre la phase liquide et la phase gel (KAV) de chaque protéine en fonction du logarithme de la masse moléculaire (Figure 20).

$$KAV = \frac{(V_e - V_m)}{(V_t - V_m)}$$

Les injections d'échantillons ont été faites à l'aide d'une seringue dans une boucle de 2 mL. Le débit choisi a été de 1 mL·min⁻¹ et la sensibilité a été ajustée en fonction des organes (allant de 0.1 à 1, de la plus forte à la plus faible sensibilité). Nous avons collecté des fractions de 5 mL qui ont été dosées par scintillation liquide β dans le cas du ⁷⁵sélénite ou par HG-QFAAS dans le cas de la SeMet.

3.8. Bases théoriques de la modélisation des transferts du sélénium

Les cinétiques d'accumulation et de dépuration du sélénium dans l'organisme entier (§ 4.2) ont été modélisées selon la théorie des modèles compartimentaux.

La modélisation de la dynamique des transferts du sélénium est basée sur la théorie des modèles compartimentaux, où l'organisme et la source de contamination sont représentés par des compartiments entre lesquels des flux de contaminants s'opèrent (un compartiment représentant un ensemble d'organes ou de tissus présentant les mêmes paramètres cinétiques).

Les hypothèses de bases sous-tendant le modèle, les conditions initiales requises pour la résolution des systèmes d'équation différentielles de premier ordre le décrivant, ainsi que les solutions analytiques correspondantes sont décrites en détail par Vray (1994) et Garnier-Laplace *et al.* (1997). Ces solutions analytiques correspondent respectivement pour la phase d'accumulation et d'élimination aux équations suivantes :

$$C_{Bivalve}(t) = C_{Eau} \sum_{i=1}^m \frac{A_i}{d_i} (1 - e^{-d_i t}) \quad (\text{Eq. 1})$$

$$C_{Bivalve}(t - t_0) = C_{Bivalve}(t_0) \sum_{i=1}^m E_i e^{-d_i (t - t_0)} \quad (\text{Eq.2})$$

avec $C_{Bivalve}(t)$, la concentration en Se dans le bivalve au temps t , C_{Eau} , la concentration en Se dans l'eau, A_i (mL d'eau g^{-1} p.f. de corps mou de bivalve) et d_i (j^{-1}), respectivement les paramètres cinétiques d'accumulation et de dépuration, t_0 , le temps initial de la phase d'élimination et E_i , la contribution du $i^{\text{ème}}$ compartiment à la

concentration totale en Se dans l'organisme ($\sum_{i=1}^m E_i = 1$). Les phénomènes de dilution

biologique ne sont pas pris en compte car aucune croissance significative des bivalves n'a été observée durant les expériences.

L'équation 1 peut être modifiée pour prendre en compte les fluctuations de la concentration en contaminant dans l'eau d'après la méthodologie développée par Le Fur (1989). En discrétisant l'évolution de la concentration en Se dans l'eau sur n intervalles de temps $[T_j, T_{j+1}]$ $j \in [1, n]$, la concentration en Se dans le bivalve au cours du temps s'écrit :

$$\forall t \in [T_j, T_{j+1}]$$

$$C_{Bivalve}(t) = \sum_{i=1}^m \frac{A_i}{d_i} \left[\sum_{j=1}^n C_{Eau\ j} \left(e^{-d_i(t-T_j)} - e^{-d_i(t-T_{j-1})} \right) + C_{Eau\ j+1} \left(1 - e^{-d_i(t-T_j)} \right) \right] \quad (\text{Eq. 3})$$

avec $C_{Eau}(t) = C_{Eau\ j+1}$

En posant :

$$D_{i,j+1} = \frac{C_{Eau\ j}}{d_i} \left(e^{d_i T_j} - e^{d_i T_{j-1}} \right) + D_{i,j}, \text{ avec } D_{i,1} = 0,$$

L'expression de l'évolution de la concentration en Se dans le bivalve se simplifie en :

$$C_{Bivalve}(t) = \sum_{i=1}^m A_i \left[\sum_{j=1}^n e^{-d_i t} D_{i,j+1} + \frac{C_{Eau\ j+1}}{d_i} \left(1 - e^{-d_i(t-T_j)} \right) \right] \quad (\text{Eq. 4})$$

Les équations 2 et 4 sont ajustées sur les données expérimentales à l'aide de l'outil solveur de Microsoft Excel 2000. Cet outil permet d'estimer les paramètres en minimisant la somme du carré des écarts (SCE) entre les données observées et le modèle. Les paramètres estimés sont les paramètres cinétiques d'accumulation et de dépuraction A_i et d_i , ainsi que les constantes E_i représentant la contribution de chacun des compartiments à la concentration totale. La qualité de l'ajustement est définie à l'aide du coefficient de détermination :

$$R^2 = \frac{SCE_{régression}}{SCE_{totale}}$$

A partir de ces paramètres, il est possible de calculer la période biologique (en jours), correspondant au temps nécessaire à l'organisme pour éliminer la moitié de la quantité de Se accumulée :

$$T_{b_i} = \frac{\ln(2)}{d_i} \quad (\text{Eq. 5})$$

Le facteur de concentration à l'équilibre ($t \rightarrow \infty$) s'écrit, sur la base de l'équation 1, de la façon suivante :

$$BCF = \sum_{i=1}^m \frac{A_i}{d_i} \quad (\text{Eq.6})$$

3.9. Analyses statistiques des résultats

Les analyses statistiques ont été réalisées avec les logiciels SIGMA-STAT (SPSS Chicago, USA) et STATISTICA (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Les tests de significativité de l'influence des différents traitements (forme de Se, dose...) sur les variables étudiées (ventilation, bioaccumulation...) ont été réalisés avec des analyses de variance classiques. Si les hypothèses de normalité et homoscédasticité étaient vérifiées, nous avons réalisé des ANOVA complétées par le test de la plus petite différence (LSD). Sinon, des tests non paramétriques de type Kruskal-Wallis ont été appliqués, suivis de comparaison post-hoc de type Dunn's.

L'ajustement des relations linéaires a été réalisé par régression classique. Les modèles non-linéaires (notamment pour l'accumulation du séléniate et de la SeMet chez les algues) a été réalisé selon un modèle de type Michaelis-Menten.

4. RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Bioaccumulation du sélénium chez *C. fluminea* : rôle de la ventilation du bivalve et de la spéciation du sélénium

Les bivalves sont des modèles biologiques très utilisés en écotoxicologie en tant que bioindicateurs de pollution (Andrès *et al.*, 1999; Gunther *et al.*, 1999), car ils peuvent accumuler d'importantes quantités de polluants dans leurs tissus, par voie directe *via* une contamination de la colonne d'eau ou par voie trophique *via* l'ingestion de particules contaminées (algues, bactéries). Cependant, l'utilisation opérationnelle de ces organismes pour le suivi des écosystèmes aquatiques, doit reposer sur une caractérisation excellente des principaux facteurs gouvernant la bioaccumulation. La pénétration des métaux/métalloïdes dans les tissus est conditionnée par leur biodisponibilité, largement dépendante de leur spéciation et du statut physiologique de l'organisme (Tessier et Turner, 1995). Ainsi l'une des premières étapes limitantes pour la bioaccumulation est la spéciation. Les autres, sont les activités valvaires et ventilatoires qui permettent l'entrée du flux d'eau dans les cavités branchiales assurant respiration et nutrition (Massabuau et Tran, 2003). Les facteurs du milieu (pO₂, pCO₂ et densité algale) peuvent également modifier la bioaccumulation, comme cela a été montré pour l'uranium et le cadmium chez *C. fluminea*, en liaison directe avec une modification de la ventilation du bivalve ou indirecte avec une modification de la spéciation du polluant (Tran *et al.*, 2001; Tran *et al.*, 2002; Tran *et al.*, 2004b). A notre connaissance, aucune étude n'a été menée concernant la prise en compte globale de ces divers facteurs dans la compréhension des mécanismes de bioaccumulation du sélénium chez le bivalve.

Les études présentées dans ce chapitre visent à étudier l'impact de facteurs du milieu sur le débit ventilatoire du bivalve *C. fluminea* et à évaluer la bioaccumulation du sélénium dans ces conditions. Les facteurs testés sont la densité d'algues, la concentration et la forme chimique de Se, et la voie de contamination (directe ou trophique).

Les résultats de ce chapitre seront présentés sous forme de 3 articles, le premier relatif à l'étude de la voie directe, le second à la voie trophique et le troisième étant axé sur une comparaison entre les deux voies.

4.1.1. Bioaccumulation du sélénium par la voie directe : effet de la ventilation du bivalve et de la spéciation du sélénium

4.1.1.1. Introduction :

Le but des recherches présentées dans ce paragraphe était d'appréhender les facteurs physiologiques et environnementaux susceptibles d'être impliqués dans les processus de bioaccumulation du sélénium par la voie directe. Les expériences ont été réalisées sur une période courte (7 jours d'acclimatation, 3 jours de contamination), permettant d'optimiser le contrôle des paramètres du milieu et de balayer de nombreuses conditions expérimentales. Ainsi, la bioaccumulation a été évaluée en fonction de la spéciation du sélénium (3 formes chimiques différentes ont été testées), et de l'activité ventilatoire du bivalve (en jouant sur des apports trophiques différents). De plus, l'effet du sélénium sur la ventilation a été également étudié.

- a) Caractérisation de la relation entre densité algale et débit ventilatoire de *C. fluminea* en absence de contamination

Tran *et al.* (2002), avaient mis en évidence une relation entre la densité d'algues (*Scenedesmus subspicatus*) et le débit ventilatoire chez *C. fluminea*, les bivalves augmentant leur débit ventilatoire pour les faibles densités d'algues. Ainsi, des états physiologiques variables avaient été obtenus par des apports trophiques différents. Ces auteurs avaient montré que ces adaptations de débit ventilatoire pouvaient modifier les processus d'accumulation du Cd par la modification des conditions d'exposition au niveau branchial. Dans le contexte de ce travail de recherche, basé sur les connaissances acquises au laboratoire sur *Chlamydomonas reinhardtii* (Morlon, 2005), le premier objectif était de caractériser le débit ventilatoire de *C. fluminea* en fonction d'une large gamme de densités algales (*C. reinhardtii*) dans nos conditions expérimentales (20 °C, pH 7, eau artificielle) en absence de contamination. C'est sur la base de ces résultats que nous avons sélectionné les valeurs d'apports trophiques menant à des états physiologiques drastiquement différents pour tester l'effet de la ventilation sur la bioaccumulation du sélénium.

b) Bioaccumulation du sélénium par la voie directe : rôle de la ventilation du bivalve et de la spéciation du sélénium

Afin de tester l'effet de l'état physiologique des organismes sur la bioaccumulation, les expositions au Se dissous ont été réalisées en présence de 2 densités algales (une faible et une forte) menant à des comportements ventilatoires bien distincts (hyperventilation et ventilation faible). L'effet de la spéciation sur la bioaccumulation a été appréhendé en testant 3 formes chimiques différentes (sélénite, séléniate, SeMet), et à 2 concentrations (50 et 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Les polluants pouvant eux-mêmes modifier la physiologie respiratoire des bivalves, nous avons mesuré les débits ventilatoires avant et pendant l'exposition au sélénium.

Après les 3 jours d'exposition, les bivalves ont été prélevés et disséqués afin d'évaluer les taux de bioaccumulation et la distribution tissulaire en fonction de la forme de sélénium utilisée. Les résultats ont été considérés en prenant en compte la spéciation du sélénium mais également l'état physiologique de l'organisme.

4.1.1.2. Article : "Bioaccumulation of waterborne selenium in the Asiatic clam Corbicula fluminea : influence of feeding-induced ventilatory activity and selenium species". Fournier E, Adam C, Massabuau JC and Garnier-Laplace J. Aquatic Toxicol: 72: 251-260

Bioaccumulation of waterborne selenium in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: influence of feeding-induced ventilatory activity and selenium species

Elodie Fournier^{a,*}, Christelle Adam^a, Jean-Charles Massabuau^b,
Jacqueline Garnier-Laplace^a

^a *Laboratoire de Radioécologie et Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire Bât 186,
BP 3, 13115 Saint-Paul-Lez-Durance cedex, France*

^b *UMR 5805, Laboratoire d'Ecophysiologie et Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques,
Université Bordeaux 1 et CNRS, Place du Dr. Peyneau, 33120 Arcachon, France*

Received 4 June 2004; received in revised form 10 January 2005; accepted 12 January 2005

Abstract

A set of experiments was performed to investigate the bioavailability and the effect of Se on the ventilatory activity of the bivalve *Corbicula fluminea*, under different conditions of both algal cell densities and dissolved Se chemical forms and concentrations. A first set of experiments was conducted without selenium to investigate the changes in the ventilatory flow rate as a function of the concentration of the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* (10^5 – 10^6 cells mL⁻¹). For algal concentrations below 2 – 3×10^5 cells mL⁻¹, ventilatory activity was highly stimulated whereas it was independent of algal densities for higher values (up to 10^6 cells mL⁻¹). To investigate the influence of this first ventilatory drive on selenium contamination process, bivalves were exposed to waterborne selenium at two different algal concentrations, selected to provide contrasting reference ventilatory activities. Three different selenium forms were studied [selenite Se(+IV), selenate Se(+VI) and selenomethionine SeMet] and were added into the water at concentrations of 50 and/or 500 μ g L⁻¹. Each selenium form induced a specific behavioural response, an increase, a decrease or no change of ventilation being observed for Se(+IV), SeMet and Se(+VI), respectively. Selenium accumulation by the organisms was investigated at the organ level for the different exposure conditions. Selenomethionine was the most bioaccumulated form, followed by selenate and selenite, respectively. Despite the bivalves displaying different ventilatory behaviours at low or high algal density, there was no evidence showing reduction or enhancement of Se uptake in the chemical domain investigated.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Corbicula*; Speciation; Selenium; Ventilation; Bioaccumulation

* Corresponding author. Tel.: +33 4 42 25 27 87; fax: +33 4 42 25 40 74.
E-mail address: elodie.fournier@irsn.fr (E. Fournier).

1. Introduction

Selenium is a naturally occurring trace element acting as an essential micronutrient for living animal organisms and thought to play such a role in plants (Seppänen et al., 2003). Typical concentrations in unpolluted freshwaters ($0.2 \mu\text{g L}^{-1}$) may be increased in connection with various anthropogenic sources (Lemly, 2004). Much higher Se concentrations (up to $650 \mu\text{g L}^{-1}$) have been found in habitats receiving irrigation drain water from seleniferous soils, agricultural lands (Cantaño et al., 1996) or runoff from deposits of coal fly ash (Robberecht and Van Grieken, 1982; Lemly, 1998). Selenium from both natural and anthropogenic sources enters surface waters primarily as the high soluble selenite Se(+IV) (SeO_3^{2-}), and as selenate Se(+VI) (SeO_4^{2-}). Organic selenides, Se(–II), including Se-amino-acids and Se-proteins, methyl selenides, and other Se-substituted analogs of organosulfur compounds, are produced by biological reduction of selenite and usually occur at lower concentrations in water than inorganic Se species. However seleno-amino-acids exhibit a greater bioavailability than inorganic species (Kiffney and Knight, 1990; Wang and Lovell, 1997). In most living organisms Se acts against oxidative damages in the form of the glutathione peroxydase (Gpx) but also as other selenoproteins, e.g. selenoprotein P and thioredoxin reductase (Arteel and Sies, 2001). In freshwaters, Se can attain levels that are toxic to wildlife and produce reproductive failure in fish for example (Lemly, 1985).

Bivalves are widely used as bioindicators of aquatic pollution, using their ability to accumulate and bioconcentrate contaminants, such as trace metals, in their tissues (Andres et al., 1999; Gunther et al., 1999). Metals can be accumulated both by direct uptake from the dissolved phase and by ingestion from the particulate phase. Various studies have demonstrated that filter feeders adjust their physiological responses to variation in food quantity and quality (Foe and Knight, 1986; Tran et al., 2002). A possible result of these physiological adjustments is a change in contaminant uptake. Moreover, the presence of waterborne metals such as Hg, Se (Watling and Watling, 1982) or U (Tran et al., 2004) can modify the bivalve's ventilation which is a primary limiting step that controls water influx and thus, the delivery of contaminants into the branchial cavities. These studies shown that metal bioavailabil-

ity is not only linked to the aqueous metal speciation, but also to the bivalve respiratory physiology that may be dependent on environmental factors such as e.g. pH, dissolved oxygen, carbon dioxide concentration, food availability. Aqueous metal uptake by bivalves has generally been quantified without taking account of the animal's physiological state and in particular without feeding the organisms throughout the experiments. Conclusions for such studies remain therefore limited as the influx rate measured without food particles is not representative of the metal influx in a natural environment where those particles are present in varying quantity and quality.

The study presented here is part of a wider research program whose aim is to characterize Se bioavailability and effects in the widespread bivalve *Corbicula fluminea*, as a function of various physiological and environmental factors. Short-term experiments have been performed to determine the bioavailability and the effect of the main oxidation states of Se on the ventilatory flow rate of *C. fluminea*. The unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* has been selected as food support, because it is a representative species of freshwater phytoplankton and its physiology has been widely studied. Se was added into the water in three different chemical forms each corresponding to an oxidation state: the two inorganic compounds Se(+VI) and Se(+IV), and the seleno-L-methionine Se(–II) which is the predominant form of Se compounds in tissues of plants and algae (Tinggi, 2003; Guo and Wu, 1998).

2. Materials and methods

2.1. Animal collection and maintenance

C. fluminea specimens were collected manually from a non-contaminated site on the River Saint-Seurin-sur-l'Isle (France). On arrival at the laboratory a few hours after collection, an homogeneous group of clams ($n = 80$) was constituted with individuals having a mean antero-posterior shell length of 28 ± 2 mm (mean \pm standard error), corresponding to a mean wet weight of 0.88 ± 0.05 g for the whole soft body. They were kept at 20 ± 0.5 °C, in a polyvinyl chloride tank ($83 \text{ cm} \times 83 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$) filled with dechlorinated tap-water over washed quartz sand (SILAQ, Mios, France) in which the animals could move freely, burrow, and

hide. Animals were fed daily with a suspension of the unicellular algae *C. reinhardtii* (total density of 2×10^5 cells mL⁻¹ within the tank just after algae addition). Half the volume of water was changed once a week. Animals were acclimated to those conditions for at least 1 month before any experiment.

2.2. Chemicals

The three selenium forms used for contamination were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). The compounds used were sodium selenite (Na₂SeO₃), sodium selenate (Na₂SeO₄) and seleno-L-methionine (C₅H₁₁NO₂Se).

2.3. Experimental conditions

Experiments were performed in polypropylene beakers (5 cm × 5 cm × 8 cm) filled with a synthetic water (Ca²⁺ 290 μM; Mg²⁺ 195 μM; Na⁺ 500 μM; K⁺ 165 μM; Cl⁻ 882 μM; SO₄²⁻ 100 μM; NO₃⁻ 500 μM; CO₃⁻ 24 μM; PO₄³⁻ 5 μM, pH 7.0 at equilibrium) over washed quartz sand (SILAQ, Mios, France). The artificial water was made according to the method of Smith et al. (2002). The experiments were performed at 20.0 ± 0.5 °C. The pH was regulated at 7.0 ± 0.1 by addition of NaOH using a pH-stat (CONSORT R301, Illkirch, Belgium). Organisms were maintained under a 14 h light–10 h dark photoperiod (4.0 ± 0.5 μmol m⁻² s⁻¹). Air was bubbled continuously into the tanks to ensure algal mixing, gas–water equilibration and to control the respiratory status of the bivalves. The ionic composition of the water and the algal cells supply were maintained constant using peristaltic pumps (Gilson, Villiers-Le-Bel, France) under flow-through conditions. During the experiments, the animals were isolated from external vibrations in the laboratory using an antivibrating bench.

2.4. Effect of algal density on the ventilatory flow rate of *C. fluminea*

A preliminary set of experiments was carried out to characterize the “baseline” of the ventilatory behaviour of *C. fluminea* as a function of the algal density, without adding any contaminant.

Experiments were performed from May to June 2003 after allowing the organisms (five replicates of

one individual per beaker) to acclimate to the synthetic water over a 7-day period, at a regulated algal density of 3–4 × 10⁵ cells mL⁻¹. This algal density was chosen according to results obtained under similar conditions by Tran et al. (2002). These authors demonstrated that these feeding conditions allow the bivalves to maintain a steady-state ventilation. Experiments were performed to investigate the changes in ventilatory activity for algal concentrations ranging from 0.5 × 10⁵ to 10⁶ cells mL⁻¹. Six algal densities were studied ((0.5–1; 1–2; 2–3; 3–4; 6–7; 9–10) × 10⁵ cells mL⁻¹). The bivalves were exposed for 2 days at the given algal density (exposure period; days 8 and 9), and then returned to the initial algal density of 3–4 × 10⁵ cells mL⁻¹ (recovery period; days 10 and 11), to test the reversibility of the phenomenon. The ventilatory flow rate was measured individually three times a day, at 10 am, 1 pm and 3 pm from day 5 of the acclimation period.

2.5. Effect of dissolved selenium on the ventilatory flow rate of *C. fluminea*

During a second set of experiments performed from July to September 2003, the bioavailability of three different forms of Se and their effect on ventilation were studied. These experiments were carried out at two different algal concentrations: (1–2) × 10⁵ and (3–4) × 10⁵ cells mL⁻¹. These algal densities were selected on the basis of the results obtained during the preliminary experiment to provide contrasting ventilatory behaviours. After acclimatizing organisms (five replicates of one individual per beaker) during a 7-day period to the synthetic water and the selected algal density (acclimation period), animals were either exposed for 3 days to selenite (Se(+IV)), selenate (Se(+VI)) (two concentrations tested, 50 and 500 μg L⁻¹) or seleno-L-methionine (Se(-II)) (one concentration of 50 μg L⁻¹). For the latter, the highest concentration (500 μg L⁻¹) was not studied because of its lack of environmental relevance. Water was regularly renewed using a flow-through system (complete renewal of the total volume of water five times a day) to keep the Se concentration and the ionic composition in the water constant. The ventilatory flow rate of each bivalve was also measured three times a day, at 10 am, 1 pm and 3 pm. At the end of the experiments, bivalves were collected and stored at -80 °C. Se quantification in the biological samples was performed 2 weeks later.

The tissular distribution of Se in bivalves was evaluated for each condition. Filtrated (<0.45 µm) and non-filtrated samples of water were taken twice a day during the exposure period to check selenium concentrations (dissolved and total i.e. dissolved + algal-bound) and oxidation state. Samples of water were stored for a few days at 4 °C prior to analysis. The results obtained from this water monitoring enabled us to be sure that in the presence of algal particles, (i) the majority of Se accumulation by *C. fluminea* was due to the uptake from the aqueous phase, (ii) there was no modification of selenium oxidation state during the experiments.

2.6. Ventilatory flow rate measurement

The ventilatory flow rate measurement was based on the determination of a volume of water cleared of algae per unit of time in a transiently closed system. During the clearance test periods, the peristaltic pumps were stopped, and the decrease in algal concentration, which is directly proportional to the ventilatory activity, was measured. The density of algae was measured by means of a Coulter counter (Beckman Coulter, Roissy, France).

Jorgensen's equation (Coughlan, 1969) was used to calculate the ventilatory flow rate of the bivalve as follows:

$$\dot{V}_w = V[(\ln X_0 - \ln X_t) - (\ln X'_0 - \ln X'_t)]/(tm)$$

where, \dot{V}_w is the ventilatory flow rate (mL h⁻¹ g⁻¹ fw); t the test duration (h), which was systematically 1/2 hour; m the bivalve body mass (g fw); V the volume of water in each chamber (mL), which was systematically 150 mL; X_0, X'_0 , the algal density at the beginning of the measurement (cells mL⁻¹) in the test chamber and the reference chamber (without any bivalve) respectively; X_t, X'_t , the algal density at the end of the measurement (cells mL⁻¹) in the test chamber and the reference chamber, respectively.

Four assumptions were made: that the algal concentration in water was homogeneous, that the decrease of algal concentration was only due to animal filtration, that all algae passing over the gills were retained, and that the ventilatory flow rate was constant throughout the test.

2.7. Analytical method (HG-QFAAS) to determine selenium concentrations

Selenium concentrations were measured using the HG-QFAAS method (Hydride Generation-Quartz Furnace Atomic Absorption Spectrometry) (Gleyzes et al., 1997), including a hydride generation vessel, a quartz tube atomizer placed in a furnace and an atomic absorption spectrometer (Perkin, 4110ZL). In this method, volatile species are generated from selenite and selenium therefore needs to be in the Se(+IV) form (detection limit 0.04 µg L⁻¹). The aqueous sample (selenite) is introduced with HCl (10%, v/v) into the hydride generator vessel. Then, the reducing agent (NaBH₄) is added and SeH₂ is formed from selenite. The volatile hydride is flushed by the carrier gas (argon) into a quartz cell (heated electrically) and atomized. Absorbance is measured at 196.0 nm using an electrodeless discharge lamp. Recording and treatment of the selenium signal are performed by an integrator.

Because HG-QFAAS only reaches selenite (Se(+IV)), an initial step to reduce selenate (Se(+VI)) into Se(+IV) was required to determine Se(+VI). Reduction was realized in HCl 4 M heated for 45 min at 90 °C. Sealed tubes were used. The selenate concentration was determined by the difference between [Se(+IV) + Se(+VI)] and [Se(+IV)]. To determine total selenium in the case of organic compounds or of natural samples contaminated by Se, destruction of the sample matrix is a prerequisite to the measurement step. Two millilitres of a reagent mixture (H₂O₂/HNO₃, 1:1, v/v) were added to 1 mL of water or to the biological sample (aliquot of 1 g at the maximum), heated at 100 °C during 1 1/2 h in a sealed system (to ensure that there was no loss by volatilization). This oxidation procedure yields mixtures of oxidation states (+IV) and (+VI). Consequently, the reduction of Se(+VI) to Se(+IV) has to be carried out as explained earlier.

2.8. Statistical analysis

Results are given as arithmetic mean ± 1 standard error. The statistical significance of treatment differences ($p \leq 0.05$) were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA) after checking assumptions of normality and homoscedasticity of error terms (SigmaStat® 2.0, SPSS Science, Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Effect of algal density on the ventilatory flow rate of *C. fluminea*

During the acclimation period (days 5–7), during which bivalves were submitted to an algal density of $3\text{--}4 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$, all the individuals had a ventilatory flow rate varying within the range of $50\text{--}100 \text{ mL h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ fw}$, stable through time (Fig. 1). During the 2-day exposure phase (days 8 and 9), the two lower algal densities tested led to a significant increase in the ventilatory flow rate. For the four other algal densities tested, no difference was observed between the ventilatory flow rate corresponding to the acclimation period and that measured during the exposure period. When bivalves were returned to the algal density of $3\text{--}4 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ (recovery period), they all recovered their initial low ventilatory flow rate (days 10 and 11). In Fig. 2, ventilation is represented as a function of the algal density. These results clearly show that low algal densities are a strong ventilatory stimulus. For algal densities lower than $(2\text{--}3) \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$

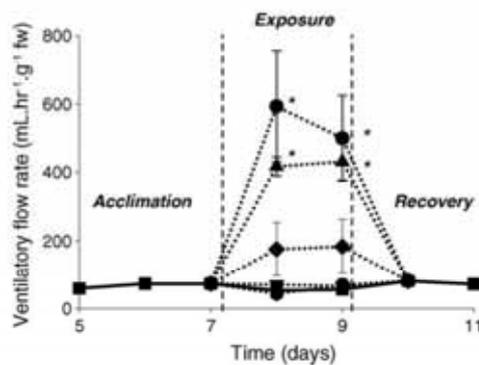


Fig. 1. Development of the ventilatory flow rate ($\text{mL h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ fw}$) of *C. fluminea* over time, at pH 7 and 20°C . A 7-day acclimation phase (at $(3\text{--}4) \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$) was followed by a 2-day exposure period (six algal densities tested), and a 2-day recovery period (at $(3\text{--}4) \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$). Results are presented as mean \pm 1 standard error ($n=5$). Algal densities observed were: circle $(0.5\text{--}1) \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$; upwards triangle $(1\text{--}2) \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$; diamond $(2\text{--}3) \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$; square $(3\text{--}4) \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$; downwards triangle $(6\text{--}7) \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$; hexagon $(9\text{--}10) \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$. Asterisks indicate that the values were significantly different from that characterizing the control ($p \leq 0.05$).

there was a significant increase in the ventilation of *C. fluminea* whereas for algal densities greater than $(2\text{--}3) \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$, bivalves remained with a low ventilatory flow rate independent of the food abundance up to the maximum density tested ($10^6 \text{ cells mL}^{-1}$). Bivalves exposed to $(1\text{--}2) \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ exhibited a ventilatory flow rate eight-fold greater than those exposed to $(3\text{--}10) \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$.

3.2. Effect of dissolved selenium on the ventilatory flow rate of *C. fluminea*

Fig. 3 shows the development in time of the ventilatory flow rate for the selected algal densities. Whatever the conditions, bivalve ventilation reached a steady state during the acclimation period. The ventilatory flow rate was not statistically different from the one measured during the previous experiment for the corresponding algal density, i.e. $400\text{--}500 \text{ mL h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ fw}$ for an algal density of $(1\text{--}2) \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ and $(50\text{--}100) \text{ mL h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ fw}$ at $(3\text{--}4) \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ (Fig. 2). This illustrates the reproducibility and the strength of the relationship between the ventilatory flow rate and algal concentration, for *C. fluminea* studied in our experimental conditions.

For all experimental conditions, Se concentrations and oxidation states remained constant in water during the 3 days of exposure ($\pm 5\%$), and, as expected, no algal-bound Se was measured by using a flow-through system.

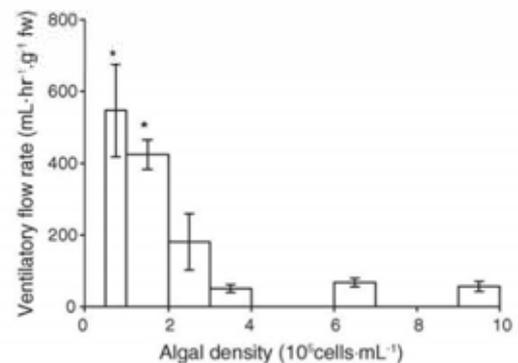


Fig. 2. Changes in the ventilatory flow rate ($\text{mL h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ fw}$) of *C. fluminea*, as a function of the algal density (cells mL^{-1}) at pH 7 and 20°C . Mean \pm 1 standard error ($n=5$). Asterisks indicate values significantly different from those characterizing the control ($p \leq 0.05$).

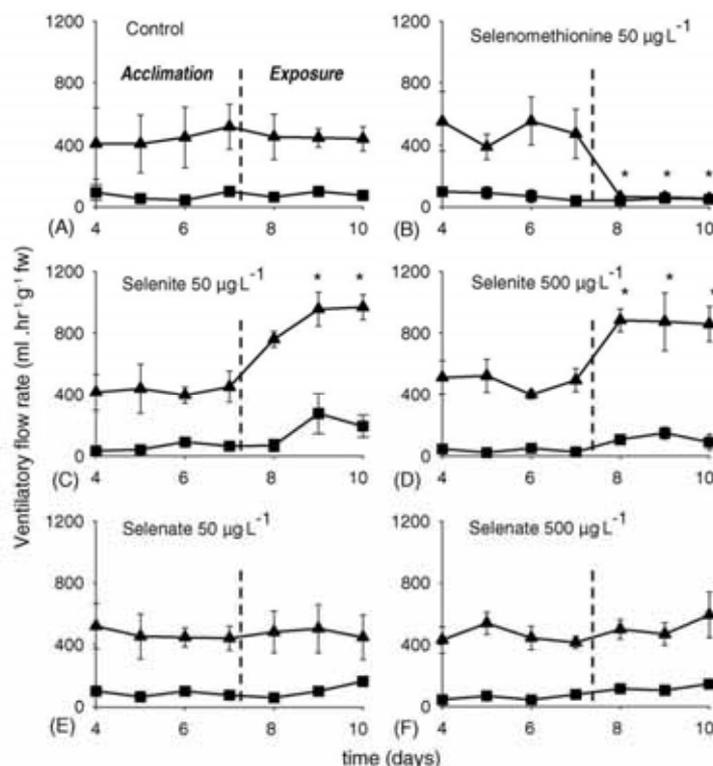


Fig. 3. Changes in the ventilatory flow rate ($\text{mL.h}^{-1}\text{g}^{-1}\text{fw}$) of *C. fluminea*, as a function of time (days). A 7-day acclimation phase was followed by a 3-day exposure period (three selenium forms tested), at two different algal densities: triangle $(1-2) \times 10^5$ cells mL^{-1} and square $(3-4) \times 10^5$ cells mL^{-1} . Results are presented as mean \pm 1 standard error. Asterisks indicate values significantly different from that characterizing the control ($p \leq 0.05$).

Fig. 3A shows logically that no change in ventilatory flow rate occurred during the exposure period for the control group (not exposed to Se). Fig. 3B shows that addition of $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of selenomethionine induced a strong decrease in the ventilatory activity of *C. fluminea* compared to that of the control group (Fig. 3A). When bivalves were exposed to dissolved selenite (Fig. 3C and D), the ventilation increased by a factor of 2 whatever the concentration used, 50 or $500 \mu\text{g L}^{-1}$ Se(+IV). Finally, selenate did not modify the ventilation of *C. fluminea* neither at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ nor at $500 \mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 3E and F). Average values of ventilatory flow rate for the different exposure conditions (mean calculated on the basis of the 3-day exposure period), are summarized in Table 1. The difference was statistically significant only for the lower algal density.

3.3. Effect of the different forms of selenium on the metalloid bioaccumulation

Results of bioaccumulation in the whole body of *C. fluminea*, at the end of the 3-day exposure period, are presented in Fig. 4. A significant bioaccumulation of each of the three forms tested at the two concentrations was evidenced. Selenite was the least bioaccumulated form whereas selenomethionine was the most bioaccumulated as regards the tested concentration of $50 \mu\text{g L}^{-1}$. A significant dose effect was noticed since at $500 \mu\text{g L}^{-1}$ bivalves accumulated more selenite and selenate than they did at $50 \mu\text{g L}^{-1}$. A significant difference of bioaccumulation between bivalves exposed to low or high algal density was only observed in the gills and visceral mass for animals exposed to selenite at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (Table 1). Selenium was distributed ho-

Table 1

Average values of ventilatory flow rate during the 3-day exposure period to different dissolved selenium forms and concentrations, and total Se concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$ fw) in the organs of *C. fluminea* at the end of the experiment

	Control		Selenite		Selenate		Selenomethionine	
	Bivalves exposed to $50 \mu\text{g L}^{-1}$							
[Algae] (cells mL ⁻¹)	$(1-2) \times 10^5$	$(3-4) \times 10^5$	$(1-2) \times 10^5$	$(3-4) \times 10^5$	$(1-2) \times 10^5$	$(3-4) \times 10^5$	$(1-2) \times 10^5$	$3-4 \times 10^5$
\dot{V}_w (mL h ⁻¹ g ⁻¹ fw)	427 ± 76 a	81 ± 7 b	871 ± 66 c	181 ± 67 b	479 ± 101 a	107 ± 8 b	62 ± 16 b	48 ± 9 b
Mantle	0.45 ± 0.05	0.35 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.37 ± 0.03	0.57 ± 0.07	0.84 ± 0.20	2.66 ± 0.64	2.00 ± 0.25
Foot/muscle	0.38 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.31 ± 0.05	0.29 ± 0.03	0.48 ± 0.07	0.46 ± 0.03	2.39 ± 0.72	1.19 ± 0.17
Gills	0.49 ± 0.03	0.52 ± 0.02	0.77 ± 0.08	0.40 ± 0.05	0.92 ± 0.20	1.04 ± 0.10	4.61 ± 1.36	3.00 ± 0.72
Visceral mass	0.43 ± 0.04	0.48 ± 0.03	0.80 ± 0.08	0.62 ± 0.05	0.95 ± 0.04	0.82 ± 0.17	4.07 ± 1.33	2.92 ± 0.57

	Control		Selenite		Selenate	
	Bivalves exposed to $500 \mu\text{g L}^{-1}$					
[Algae] (cells mL ⁻¹)	$(1-2) \times 10^5$	$(3-4) \times 10^5$	$(1-2) \times 10^5$	$(3-4) \times 10^5$	$(1-2) \times 10^5$	$(3-4) \times 10^5$
\dot{V}_w (mL h ⁻¹ g ⁻¹ fw)	427 ± 76 a	81 ± 7 b	868 ± 92 c	110 ± 27 b	538 ± 92 a	122 ± 14 b
Mantle	0.45 ± 0.05	0.35 ± 0.02	0.98 ± 0.09	1.38 ± 0.16	3.52 ± 0.31	2.56 ± 0.40
Foot/muscle	0.38 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.75 ± 0.08	0.94 ± 0.19	2.93 ± 0.27	2.29 ± 0.27
Gills	0.49 ± 0.03	0.52 ± 0.02	2.09 ± 0.31	2.26 ± 0.47	4.23 ± 0.25	3.03 ± 0.65
Visceral mass	0.43 ± 0.04	0.48 ± 0.03	1.93 ± 0.23	2.14 ± 0.34	3.60 ± 0.32	2.44 ± 0.50

Results are presented as mean ± 1 standard error ($n = 5$). Ventilatory flow rates marked with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

mogeneously within all tissues for the control group, as for selenate or selenomethionine exposed animals.

4. Discussion

4.1. Effect of algal density on the ventilatory flow rate of *C. fluminea*

The ventilation of *C. fluminea*, which is a filter feeder, is strongly dependent on the algal density, with a strong increase (8×) when the animals are exposed to low algal density ($(1-2) \times 10^5$ cells mL⁻¹). This pattern has already been reported for *C. fluminea* by Tran et al. (2002). For algal densities higher than $(2-3) \times 10^5$ cells mL⁻¹ and up to 10^6 cells mL⁻¹, the ventilation remained stable at a low level and became largely independent of food abundance. Under these feeding conditions, and in normoxic waters, the animals are in a steady state and have a low ventilatory flow rate of about $50-100 \text{ mL h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ fw}$. There is a significant stimulus of ventilation for algal densities lower than $(2-3) \times 10^5$ cells mL⁻¹ where ventilation rises up to rates varying between 400 and $600 \text{ mL h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ fw}$. The ventilatory adjustment we present here, with *C.*

reinhardtii, is drastically different from previously reported data from Foe and Knight (1986) in the same species *C. fluminea*. They only reported a similarly high ventilatory flow rate (about $400 \text{ mL h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ fw}$) for animals fed with *Ankistrodesmus* at algal density covering the range 10^5-10^6 cells mL⁻¹. Tran et al. (2002) have investigated the influence of algal density and of temperature on the ventilation of *C. fluminea* using a methodology comparable to ours. They used the unicellular green alga *Scenedesmus subspicatus* studied at two different temperatures: 15 and 25 °C. The ventilatory flow rate was stimulated for algal densities less than $(1-2) \times 10^5$ cells mL⁻¹ at 15 °C whereas, at 25 °C the stimulation occurred for densities below $(4-5) \times 10^5$ cells mL⁻¹. Our results fit correctly with these results since the temperature we used (20 °C) was an intermediate value between 15 and 25 °C used by Tran et al. (2002), and the ventilation was stimulated for algal densities less than $(2-3) \times 10^5$ cells mL⁻¹. The ventilatory flow rate of *C. fluminea*, maintained in steady state fed with *S. subspicatus* was about $13 \text{ mL h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ fw}$ at 15 °C whereas it was $27 \text{ mL h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ fw}$ at 25 °C (Tran et al., 2002). In our conditions, the ventilatory flow rate in steady state fed with *C. reinhardtii* is ca. $80 \text{ mL h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ fw}$

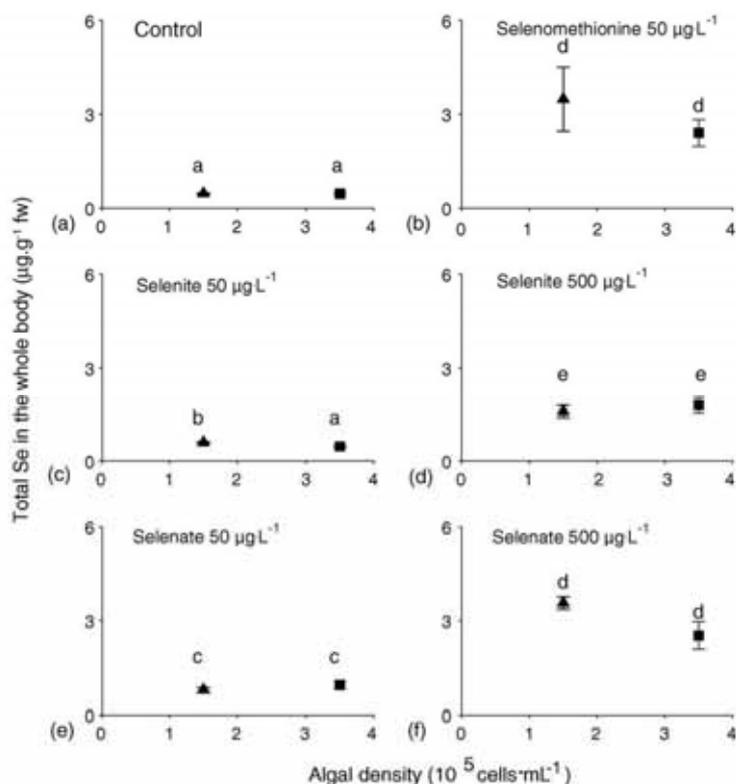


Fig. 4. Bioaccumulation of dissolved selenium at the end of the 3-day exposure period for *C. fluminea*, at the two algal densities: triangle $(1-2) \times 10^5$ cells mL⁻¹ and square $(3-4) \times 10^5$ cells mL⁻¹. Results are presented as mean \pm 1 standard error ($n=5$). Groups marked with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$).

at 20 °C. This difference in the reference ventilation could be explained by the fact that bivalves were fed with different algal species, probably having different nutritional quality.

4.2. Relationship between ventilation, selenium species and bioaccumulation

The ventilation can be modified when bivalves are exposed to waterborne selenium and this disturbance depends on the selenium forms. Changes in the respiratory physiology (ventilation activity and/or valve movement) of *C. fluminea* have already been shown after addition of other metals, both essential and non-essential such as Cd, Cu or U (Tran et al., 2003a, 2003b, 2004; Fournier et al., 2004). To our knowledge, only a

single study (Watling and Watling, 1982) has reported on the effect of selenium on ventilatory activity of a bivalve. The authors used the marine green mussel *Perna perna* and they only tested selenite effect during a 1 h exposure period instead of 3 days in the present work. They reported an inhibition of ventilation at selenite concentrations ranging from 0 to 300 µg L⁻¹, a stimulation from 300 to 700 µg L⁻¹ and again an inhibition at higher values. The present results show on the contrary, that selenite induced a strong ventilatory stimulation at 50 and 500 µg L⁻¹ with a dose dependent time course. We nevertheless note that the maximum ventilatory flow rate at 50 and 500 µg L⁻¹ was not statistically different, 871 ± 66 and 868 ± 92 mL h⁻¹ g⁻¹ fw, respectively. For fish, Lemly (1993) found that selenium (a mix of dietary selenium (5.16 µg g⁻¹) and wa-

terborne selenate:selenite ($4.83 \mu\text{g L}^{-1}$) caused gill damage that decreased respiratory capacity while increasing oxygen consumption. This increased oxygen demand might explain the strong stimulation of ventilation activity observed for selenite.

Tran et al. (2002) exposed *C. fluminea* to waterborne Cd for 15 days at two different algal concentrations providing different ventilatory activities. They demonstrated that the metal accumulation processes from the dissolved fraction can be closely related to the animal's feeding-induced ventilatory activity. In the present work, at $50 \mu\text{g L}^{-1}$, selenite stimulates ventilation at both algal densities. We note that at $(1-2) \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$ the ventilation was 871 ± 66 instead of 181 ± 67 at $(3-4) \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$. Regarding bioaccumulation of Se, bivalve's gills and visceral mass accumulated more selenite under low algal density conditions (see Table 1). Thus, this data confirms that animal's feeding-induced ventilation can influence the accumulation processes. However at $500 \mu\text{g L}^{-1}$ there was no statistical difference in bioaccumulation between bivalves exposed to low and high algal density whereas they did display different ventilatory behaviour. This could indicate that a regulation occurred. Finally, we note that the valve opening duration was not recorded, however the time spent open also controls the delivery of contaminants.

The ventilatory response to selenomethionine was drastically different as it strongly inhibits ventilation. In response to toxic components (Hg, U, etc.) bivalves often decrease their ventilatory activity as a protective mechanism. In the case of seleno-L-methionine, as this form is known to be very toxic (96 h LC_{50} $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ for juvenile amphipods, Hyne et al., 2002), we suggest that a protective mechanism is established, expressed by a strong decrease of the ventilation activity of the animals. This assumption is supported by our results, as, whatever the algal densities, the animals exhibited the same ventilatory flow rates and bioaccumulation status. Finally as regards selenate, no influence on the ventilatory flow rate was observed, which could indicate that this form was not detected. Clearly as regards selenate, ventilation does not appear to be a limiting factor, as, despite the large difference of ventilation, there is no significant difference in bioaccumulation rates. We suggest again that there was a regulation at these high tested concentrations which could explain this absence of ventilation influence.

4.3. Relationship between selenium forms and bioaccumulation process

As found in the literature for several species of algae and fish, selenoaminoacids such as selenomethionine exhibit the greatest bioavailability (Kiffney and Knight, 1990; Wang and Lovell, 1997), as compared to selenite and selenate. In our conditions, selenate is more bioavailable than selenite. Selenate bioaccumulation for several species decreases with an increase of sulphate (Riedel and Sanders, 1996; Ogle and Knight, 1996). Selenate is generally considered as an analogue of sulphate, which suggests that it could be transported into the cells by sulphate channels. Whatever the form, once taken up by the organism, Se is generally incorporated into selenoproteins. Animals synthesize many different intermediary metabolites (hydrogen selenide being a key metabolite) in the course of converting inorganic Se to organic forms. Besides this metabolic pathway that has been evidenced in animals and humans, selenomethionine offers an additional pathway with a direct incorporation into Se-containing proteins without being discriminated from methionine (Ganther, 1999). This could explain the high bioavailability of seleno-L-methionine in our experiments.

5. Conclusions

The present work demonstrates that the ventilation of *C. fluminea* can be influenced by algal density, but also by the presence of selenium. The ventilatory response is closely dependent on the metal form: selenomethionine inhibits, selenite stimulates and selenate does not influence ventilation. The ventilatory response to selenomethionine is likely to be an adaptation, but the difference in ventilatory activity evidence for selenite and selenate exposures does not significantly influence metal bioaccumulation at the tested concentrations. It suggests that at these high concentrations, ventilation is not a limiting factor.

Acknowledgements

We thank I. Cavalié and V. Camilleri for their technical assistance in selenium measurements. This work is part of the ENVIRHOM program funded

by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety.

References

- Andres, S., Baudrimont, M., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C., Boudou, A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2462–2471.
- Arteel, G.E., Sies, H., 2001. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10, 153–158.
- Cantafio, A.W., Hagen, K.D., Lewis, G.E., Bledsoe, T.L., Nunan, K.M., Macy, J.M., 1996. Pilot-scale selenium bioremediation of San Joaquin drainage water with *Thauera selenatis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 3298–3303.
- Coughlan, J., 1969. The estimation of filtering rate from clearance of suspension. *Mar. Biol.* 2, 356–358.
- Foe, C., Knight, A., 1986. Growth of *Corbicula fluminea* (bivalvia) fed artificial and algal diets. *Hydrobiologia* 133, 155–164.
- Fournier, E., Tran, D., Denison, F., Massabuau, J.C., Garnier-Laplace, J., 2004. Valve closure response to uranium exposure for a freshwater bivalve *Corbicula fluminea*: quantification of the influence of pH. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1108–1114.
- Ganther, H.E., 1999. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* 20, 1657–1666.
- Gleyzes, C., Seby, F., Lespes, G., Potin-Gautier, M., 1997. Validation of the inorganic selenium speciation by the HG-QFAAS method using experimental design. *Analysis* 25, 273–278.
- Gunther, A.J., Davis, J.A., Hardin, D.D., Gold, J., Bell, D., Crick, J.R., Sceffo, G.M., Sericano, J., Stephenson, M., 1999. Long-term bioaccumulation monitoring with transplanted bivalves in the San Francisco estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 170–181.
- Guo, X., Wu, L., 1998. Distribution of free seleno-amino acids in plant tissue of *Melilotus indica* L. grown in selenium-laden soils. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 39, 207–214.
- Hyne, R.V., Hogan, A.C., Pablo, F., Roach, A.C., 2002. Toxicity of selenomethionine- and seleno-contaminated sediment to the amphipod *Corophium* sp. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 52, 30–37.
- Kiffney, P., Knight, A., 1990. The toxicity and bioaccumulation of selenate, selenite and seleno-L-methionine in the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Arch. Environ. Toxicol.* 19, 488–494.
- Lemly, A.D., 1985. Toxicology of selenium in a freshwater reservoir: implication for environmental hazard evaluation and safety. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 10, 314–338.
- Lemly, A.D., 1993. Metabolic stress during winter increases the toxicity of selenium to fish. *Aquat. Toxicol.* 27, 133–158.
- Lemly, A.D., 1998. *Selenium Assessment in Aquatic Ecosystems*. Springer, New York.
- Lemly, A.D., 2004. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 59, 44–56.
- Ogle, R.S., Knight, A.W., 1996. Selenium bioaccumulation in aquatic ecosystems: 1. Effects of sulfate on the uptake and toxicity of selenate in *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 30, 274–279.
- Riedel, G.F., Sanders, J.G., 1996. The influence of pH and media composition on the uptake of inorganic selenium by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1577–1583.
- Robberecht, H., Van Grieken, R., 1982. Selenium in environmental waters: determination, speciation and concentration levels. *Talanta* 29, 823–844.
- Seppänen, M., Turakainen, M., Hartikainen, H., 2003. Selenium effects on oxidative stress in potato. *Plant Sci.* 165, 311–319.
- Smith, E.J., Davison, W., Hamilton-Taylor, J., 2002. Methods for preparing synthetic freshwaters. *Water Res.* 36, 1286–1296.
- Tinggi, U., 2003. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicol. Lett.* 137, 103–110.
- Tran, D., Boudou, A., Massabuau, J.C., 2002. Relationship between feeding-induced ventilatory activity and bioaccumulation of dissolved and algal-bound cadmium in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 327–333.
- Tran, D., Ciret, P., Ciutat, A., Durrieu, G., Massabuau, J.C., 2003a. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 914–920.
- Tran, D., Fournier, E., Durrieu, G., Massabuau, J.C., 2003b. Copper detection in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: optimum valve closure response. *Aquat. Toxicol.* 65, 317–327.
- Tran, D., Massabuau, J.C., Garnier-Laplace, J., 2004. The effect of carbon dioxide on uranium bioaccumulation in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 739–747.
- Wang, C., Lovell, R.T., 1997. Organic selenium sources, selenomethionine and selenocyst, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 152, 223–224.
- Watling, H.R., Watling, R.J., 1982. Comparative effects of metals on the filtering rate of the brown mussel (*Perna perna*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 29, 651–657.

4.1.1.3. Principales avancées et conclusions

Les études expérimentales décrites dans cette publication visaient à acquérir des données relatives aux facteurs environnementaux et physiologiques impliqués dans les processus de bioaccumulation du sélénium chez *C. fluminea* par la voie directe. Les avancées suivantes ont été obtenues :

a) Caractérisation de la relation entre la densité algale et le débit ventilatoire de *C. fluminea* en absence de contamination

En accord avec les études menées par Tran *et al.* (2002), nous avons confirmé que la concentration de phytoplancton pouvait modifier le comportement ventilatoire de *C. fluminea*.

Nous avons observé un phénomène d'hyperventilation chez *C. fluminea* pour des quantités de nourriture inférieures à $2-3 \times 10^5$ cells·mL⁻¹. Au-delà, nous avons observé un plateau indiquant un débit ventilatoire de *C. fluminea* faible, stable et indépendant de la quantité de nourriture. Deux densités algales $1-2 \times 10^5$ cells·mL⁻¹ et $3-4 \times 10^5$ cells·mL⁻¹ (engendrant des comportements ventilatoires distincts, une hyperventilation de l'ordre de 400 mL·h⁻¹·g⁻¹ p.f. et une ventilation stable de l'ordre de 80 mL·h⁻¹·g⁻¹ p.f.) ont ainsi été retenues pour les expériences qui ont suivi.

b) Bioaccumulation du sélénium par la voie directe : rôle de la ventilation du bivalve et de la spéciation du sélénium

Les mesures d'activité ventilatoire ont été réalisées pendant les 3 jours d'exposition et indiquent que la présence de sélénium peut, elle aussi, modifier le comportement ventilatoire de *C. fluminea* et que ceci est largement dépendant des formes de sélénium utilisées. Quelle que soit la dose de sélénium utilisée, le sélénite stimule la ventilation, la SeMet l'inhibe, et le séléniat n'a aucun effet. Les effets sur la ventilation ne sont significatifs que pour la faible densité d'algues. Etant donné que la SeMet est connue pour être toxique (Hyne *et al.*, 2002), nous suggérons l'établissement d'un mécanisme de protection exprimé par une diminution du débit ventilatoire.

Ce phénomène a déjà été observé pour d'autres métaux toxiques comme l'U ou le Hg (Watling et Watling, 1982; Tran *et al.*, 2004b). Watling et Watling (1982), ont rapporté un comportement ventilatoire très complexe chez la moule *Perna perna* suite à une exposition à du sélénite. Une inhibition de la ventilation pour des concentrations allant de 100 à 300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, une stimulation de 300 à 700 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et une diminution pour les plus fortes valeurs. Cette réponse face au sélénite est originale et laisse suggérer des perturbations occasionnées au niveau branchial.

Les résultats de bioaccumulation montrent que chaque forme de Se s'accumule à des taux différents. Dans le cas du sélénite, bien que des quantités extrêmement élevées passent sur les branchies à cause de la forte réponse hyperventilatoire, il s'accumule très peu. En revanche, bien que la SeMet diminue la ventilation de *C. fluminea*, elle est largement bioaccumulée. Le facteur spéciation apparaît donc très important dans les processus de bioaccumulation du sélénium par la voie directe. La SeMet présente une plus grande biodisponibilité par rapport aux formes inorganiques. L'effet de la forme chimique de Se sur sa bioaccumulation par la voie directe, a principalement été étudiée chez des microalgues d'eau douce, et montrent qu'effectivement, la SeMet serait mieux accumulée que les formes inorganiques (Kiffney et Knight, 1990; Riedel *et al.*, 1991). Ceci a également été montré chez la daphnie *Daphnia magna* (Besser *et al.*, 1993). Quelle que soit sa forme, une fois accumulé par l'organisme, le sélénium est généralement incorporé dans les sélénoprotéines. Dans le cas du Se inorganique, de nombreux métabolites intermédiaires doivent être synthétisés pour cette incorporation. En ce qui concerne la SeMet, elle est incorporée directement dans le pool des protéines sans être discriminée de la méthionine (Ganther, 1999). Son analogie avec la méthionine pourrait expliquer sa forte biodisponibilité.

Les débits ventilatoires des bivalves exposés à faible ou à forte densité algale restent différents (hyperventilation ou ventilation faible) en présence de sélénite et de séléniate et, en revanche, ne le sont plus en présence de SeMet, où le débit ventilatoire est très faible dans les 2 conditions (il n'est pas différent du débit ventilatoire de référence en conditions non contaminées). Ainsi, ventilation mais aussi bioaccumulation suite à l'exposition à la SeMet sont identiques à faible ou à forte densité d'algues. En ce qui concerne sélénite et séléniate, le lien entre débit ventilatoire et bioaccumulation n'est pas direct. En effet, bien que les activités ventilatoires entre bivalves exposés à faible ou forte densité algale soient différents, ceci n'influence pas les processus d'accumulation pour les concentrations testées. Ceci suggère qu'aux fortes concentrations de Se étudiées, la ventilation ne semble pas être un facteur limitant.

En conclusion, dans nos conditions expérimentales et aux concentrations testées, la prise en compte de la forme chimique de Se semble essentielle pour expliquer la bioaccumulation du sélénium par la voie directe, tandis que la ventilation, bien que largement affectée par le sélénium, ne semble pas être un facteur limitant.

4.1.2. Bioaccumulation du sélénium par la voie trophique : effet de la ventilation du bivalve et de la spéciation du sélénium

4.1.2.1. Introduction

Le phytoplancton joue un rôle important dans le cycle biogéochimique du sélénium (Fan *et al.*, 2002) et constitue une source importante de Se pour les invertébrés aquatiques (Zhang *et al.*, 1990). Les microalgues accumulent le sélénium présent dans la colonne d'eau, le transforment partiellement en formes organiques (SeMet, SeCyst) et le transfèrent aux maillons trophiques supérieurs (Fan *et al.*, 2002). Cette accumulation et cette biotransformation en composés organiques le long de la chaîne trophique pourraient être en partie responsables de la toxicité du sélénium dans les écosystèmes aquatiques.

Le présent paragraphe s'intéresse à l'impact des facteurs physiologiques et environnementaux cités précédemment (ventilation du bivalve - spéciation du sélénium) sur les processus de bioaccumulation du sélénium apporté par la voie trophique chez *C. fluminea*. Le transfert trophique du sélénium a été évalué après ingestion par le bivalve d'algues contaminées. Afin de tester l'effet de la spéciation sur la bioaccumulation, les algues ont été exposées par la colonne d'eau avec 3 formes de Se différentes. L'apport trophique s'est fait à 2 densités algales comme dans l'étude précédente, afin de tester l'effet du facteur ventilation du bivalve sur la bioaccumulation. Les effets directs du sélénium sur la ventilation ont également été appréhendés. A notre connaissance, l'effet d'un métal/métalloïde apporté par la voie trophique sur la ventilation d'un bivalve n'a jamais été étudié.

a) Bioaccumulation du sélénium chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*

Pour pouvoir étudier le transfert trophique du sélénium chez *C. fluminea* via des algues contaminées, il a fallu tout d'abord caractériser l'accumulation du sélénium chez l'algue verte *C. reinhardtii*.

Les algues ont été exposées pendant 1 heure, à des concentrations allant jusqu'à 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et à partir des 3 formes de Se (sélénite, séléniate, SeMet). Cette expérience nous a permis de choisir les conditions d'exposition des algues, pour dimensionner le transfert trophique vers *C. fluminea*.

Les algues exposées à la plus forte concentration ont été observées au microscope électronique à transmission et la microlocalisation du sélénium a été analysée sur des coupes algales épaisses (200 nm) à l'aide d'une sonde X.

b) Bioaccumulation du sélénium par la voie trophique : rôle de la ventilation du bivalve et de la spéciation du sélénium

Les bivalves ont été exposés pendant 3 jours à des algues contaminées à deux concentrations différentes de Se et à partir de sélénite, séléniate ou de SeMet (chaque condition correspondant à une charge précise en Se), afin d'évaluer les facteurs spéciation et concentration, et à 2 densités d'algues afin de tester le facteur ventilation. Le débit ventilatoire a été suivi pendant les 3 jours d'expérimentation afin d'analyser si le sélénium avait un effet sur le débit ventilatoire lorsqu'il était apporté par la voie trophique.

Les bivalves ont été prélevés après les 3 jours d'exposition et disséqués pour l'analyse de la bioaccumulation au niveau des organes. Le transfert trophique de chaque forme de Se a été évalué en prenant en compte la concentration totale de Se dans les algues, la quantité totale d'algues dans le milieu et le débit ventilatoire des organismes.

4.1.2.2. Article : “Selenium bioaccumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* and transfer to *Corbicula fluminea* : Role of Se speciation and bivalve's ventilation.” Fournier E, Adam C, Massabuau JC, and Garnier-Laplace J. *Soumise à Environ Toxicol Chem.*

**Selenium bioaccumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*
and subsequent transfer to *Corbicula fluminea*:
Role of Se speciation and ventilation of bivalve.**

Elodie FOURNIER[†], Christelle ADAM[†], Jean-Charles MASSABUAU[‡], Jacqueline GARNIER-LAPLACE[†]

[†] Laboratoire de Radioécologie et Ecotoxicologie, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire Bât 186, BP 3, 13115 Saint-Paul-Lez-Durance cedex, France

[‡]UMR 5805, Laboratoire d'Ecophysiologie et Ecotoxicologie des Systèmes Aquatiques, Université Bordeaux 1 et CNRS, Place du Dr. Peyneau, 33120, Arcachon, France

Tel : +(33) 4 42 19 94 13

Fax : +(33) 4 42 19 91 49

e-mail: elodie.fournier@irsn.fr

Abstract

The uptake of Se by the freshwater alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the subsequent transfer to the Asiatic clam *Corbicula fluminea* was investigated. The objective was to investigate the bioavailability of algal-bound Se for *C. fluminea* while taking into account Se speciation and bivalve ventilation. First, uptake rates of waterborne selenium (selenite, selenate, selenomethionine) in the algae during a 1-hour exposure period were determined in a range of concentrations up to 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. It was shown that a saturation of the transport occurs for selenate and selenomethionine, whereas it was linear for selenite. These data were used to set the algae contamination for the study of the trophic transfer to the clam. Three parameters were studied : the form of selenium, the algal density and the Se burden in the algae. The results show that for a fixed algal density, Se-contaminated algal diet does not modify ventilation. In this case, the driving factor for ventilation is the algal density, the ventilation being enhanced for low algal densities. On the basis of the ventilatory flow rate measurements, and Se burdens in algae, it was found that bioaccumulation of Se in *C. fluminea* was proportional to the total quantity of Se passing through the whole organism, but with a lesser assimilation efficiency for selenomethionine than for the inorganic forms. These results underline the importance of both physiological factors and speciation in the understanding of the trophic transfer of Se.

Key words: alga, selenium, bivalve, ventilation, trophic transfer

Introduction

Selenium is a normally occurring trace element. Typical concentrations in unpolluted freshwaters range from $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ to $0.20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [1-2] but waters draining from seleniferous soils may contain elevated Se concentrations, up to $1400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [3]. Se concentrations in water systems may also increase in connection with various anthropogenic sources (e.g. coal mining and combustion, oil refinement, agricultural runoff from seleniferous soil). In aquatic ecosystems, selenium exists as several chemical species, as four main oxidation states : (-II) ; (0) ; (+IV) and (+VI). Its speciation is both controlled by thermodynamic equilibria and by slow kinetic oxidation-reduction reactions, including biochemical or surface processes [4]. In well-aerated to moderately oxidizing conditions occurring in surface waters, the dominant forms are reported to be the inorganic forms selenite Se(+IV) and/or selenate Se(+VI). Organic selenides (Se(-II) species) usually occur in water at lower concentrations than inorganic species [5].

Selenium is known to be an essential micro-nutrient [6] for a wide variety of plants and animals, ranging from microorganisms (including many phytoplankton species) to man [7-8]. It plays an important role in antioxidant defense in the form of glutathione peroxidase but also as other selenoproteins, e.g. selenoprotein P and thioredoxin reductase [6]. Its essential role may shift to a toxicity within a very narrow range of concentrations. The toxicity of Se in aquatic ecosystems is mainly linked to its uptake and biotransformation into organo-selenium throughout the food-web transfers. Thus, microalgae play a major role in the Se ecotoxic effects, since they accumulate Se from the water column, partially transform it into organic selenium (e.g. selenomethionine, selenocysteine) and transfer it to higher organisms [5]. Thus, phytoplankton may constitute an important source of selenium for aquatic invertebrates, and hence control Se chronic toxicity. The prevalence of Se transfer by the trophic route was shown by Zhang *et al.* (1990) [9], who found that Se accumulation *via* food (^{75}Se -labelled *Phaeodactylum tricoratum*), in the clam *Puditapes philippinarum* was over one order of magnitude more important than *via* the water.

The bivalve species *Corbicula fluminea* (Asiatic clam) is widely distributed in European water ways. It is largely used as a bioindicator species, due to its water filtering activity, and subsequent ability to accumulate various contaminants. The two main routes for metal uptake are the ingestion of contaminated algae and the influx of dissolved contaminants at the gill level. Various studies have shown that filter feeders such as bivalves are able to adjust their physiological responses to variations in food quantity and quality [10-11]. As ventilation controls the water influx, a possible result of these adjustments is a change in contaminant uptake [10]. Moreover, in the presence of waterborne contaminants, bivalves can respond rapidly by closing their valves and/or by decreasing their ventilatory activity [12-15]. These studies emphasize the importance of taking into account the respiratory activity of the bivalves for studies on the global bioavailability of contaminants.

The research presented here is part of a wider program whose aim is to characterize Se bioavailability and effects in *C. fluminea*, as a function of a number of physiological and environmental key factors. Previous studies concerning bioaccumulation and effect of waterborne Se on bivalves, have highlighted the role of the oxidative state of Se in the water column : Se bioavailability and toxicity both critically depend on the chemical form and ventilation is largely modified by selenium [16], with a specific behavioural response according to the oxidation state [11]. However up to now, little is known about the primary mechanisms involved in these responses.

The experiment presented in this paper was carried out to complete these studies on the direct pathway [11], in order to investigate both aspects of the biogeochemical cycle of Se in

freshwaters. The present study deals with the bioaccumulation and effect of dietary Se on *C. fluminea* after the ingestion of algal-bound Se. The green alga *Chlamydomonas reinhardtii* was chosen as a representative species of phytoplankton, serving as a vector of Se contamination to the bivalve. The algae were exposed to 3 different chemical forms of dissolved selenium : selenite Se(+IV), selenate Se(+VI) and selenomethionine SeMet. These contaminated algae were then distributed to the bivalves. Two contamination factors were studied : algal density and selenium concentration. The effect of algal-bound selenium on the ventilatory behaviour of the bivalve, was studied for the 3 chemical forms. Finally, the transfer of Se to *C. fluminea* was investigated taking into account the ventilatory flow rate that can potentially be influenced by both algal density and algal-bound selenium.

Materials and methods

Maintenance of test organisms

Stock cultures of the freshwater algae *C. reinhardtii* (11/32B) were obtained from the Culture Collection of Algae and Protozoa (Cumbria, UK). Cells were grown in 3-liter glass flasks containing 2 liters of high salt medium [17]. These batch cultures were maintained under constant illumination ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), with rotary agitation (100 rpm), air bubbling and at an ambient temperature of $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$. For regular maintenance, ca. 200 mL of culture were transferred into a fresh medium (initial pH 7) twice a week.

C. fluminea specimens were collected manually from River Saint-Seurin-sur l'Isle (France). On arrival at the laboratory a few hours after collection, a homogeneous group of 60 clams was constituted with a mean antero-posterior shell length of $28 \pm 4 \text{ mm}$ (mean \pm standard error), corresponding to a mean wet weight of $0.90 \pm 0.05 \text{ g}$ for the whole soft body. They were maintained at $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, in a polyvinyl chloride tank (83 x 83 x 20 cm) filled with dechlorinated tap-water over washed quartz sand (SILAQ, Mios, France) in which the animals could move freely. Animals were fed daily with a suspension of *C. reinhardtii* (total density of $2 \times 10^5 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ within the tank just after the addition). Half the volume of water was changed once a week.

Chemical and exposure medium

Exposure experiments for each test organism, algae and clams, were performed in an artificial freshwater (Ca^{2+} 290 μM ; Mg^{2+} 195 μM ; Na^{+} 500 μM ; K^{+} 165 μM ; Cl^{-} 882 μM ; SO_4^{2-} 100 μM ; NO_3^{-} 500 μM ; HCO_3^{-} 24 μM ; PO_4^{2-} 5 μM), at pH 7 and $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$. The artificial water was made according to the method of Smith *et al.* (2002) [18].

The three selenium forms used for contamination were sodium selenite (Na_2SeO_3), sodium selenate (Na_2SeO_4) and seleno-L-methionine ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Se}$) (SIGMA Aldrich, Steinheim, Germany).

Selenium uptake in Chlamydomonas reinhardtii

The objective of this preliminary study was to investigate the uptake of the three forms of Se by *C. reinhardtii* in order to define the parameters of algal contamination for the trophic transfer to bivalves. A large range of concentrations of Se(+IV), Se(+VI) and SeMet (up to $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) were tested.

Cells were collected by centrifugation (15 000 g ; 10 min ; Beckman) of batch cultures in end-exponential growth phase and resuspended in the artificial water at a density of ca. $10^7 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ to rinse the cells. Algal densities were measured using a Coulter Z2 particle Counter (Beckman Coulter, Roissy, France). Experiments were performed in glass erlenmeyer flasks containing 100 mL of artificial water ($n = 3$ per condition), agitation and illumination conditions being similar to those used for algal cultures. For each experiment, cells were

inoculated at a density of 10^6 cells·mL⁻¹ and pH was adjusted at 7.00 ± 0.05 by addition of NaOH 0.1 M. To characterize selenium uptake in *C. reinhardtii*, cells were exposed for 1 hour to Se(+IV), Se(+VI) and SeMet at 4 concentrations for each form (200, 500, 1000 and 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). At the end of the 1-hour exposure period, suspensions were centrifuged at 15 000 g for 10 min and resuspended in 100 mL of artificial water for a second centrifugation cycle to rinse the cells. Pellets were then recovered to be analyzed for Se intracellular burden, and/or to constitute food source for *C. fluminea*.

To examine whether Se uptake was dependent on ambient concentration and/or Se form, the classical Michaelis-Menten enzymatic model was used to model the uptake flux and characterize the transport. The uptake flux $[\text{Se}]_{\text{flux}}$ expressed in $\text{pg}\cdot(10^5 \text{ cells})^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ is given by the following equation :

$$[\text{Se}]_{\text{flux}} = \frac{V_m \cdot [\text{Se}]_{\text{water}}}{K_m + [\text{Se}]_{\text{water}}} \quad (1)$$

where, $[\text{Se}]_{\text{water}}$ is the concentration of dissolved Se in water ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), V_m is the maximum uptake rate ($\text{pg}\cdot(10^5 \text{ cells})^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) and K_m is the half-saturation constant (concentration of Se in solution at which the uptake rate is half the maximum uptake rate, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Effect of algal-bound Se on the ventilatory flow rate and measurement of selenium uptake by Corbicula fluminea

The aim of this experiment was to characterize the bioavailability of the three forms of Se uptaken by the algae, and their effect on ventilation. Experiments were performed in beakers (5 x 5 x 8 cm) containing one bivalve each, filled with artificial water over washed quartz sand (SILAQ, Mios, France). Temperature ($20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) and pH (7.00 ± 0.05) were regulated. Organisms were maintained under a constant illumination ($3.0 \pm 0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and a 14 h light : 10 h dark photoperiod. Air was bubbled continuously into the tanks to improve algal mixing, gas-water equilibration and to control the physiological respiratory status of the bivalves. Peristaltic pumps (Gilson, Villiers-Le-Bel, France) permitted water renewal 5 times a day to maintain ionic composition in experimental units and to feed each unit continuously with a suspension of *Chlamydomonas reinhardtii* algae. Note that during the experiments, the animals were isolated from external vibrations in the laboratory using an antivibrating bench [19].

Before any experiment, bivalves were acclimated (5 replicates per condition) during a 7-day period to the synthetic water composition at two different algal densities : $1\text{-}2\cdot 10^5$ cells·mL⁻¹ and $3\text{-}4\cdot 10^5$ cells·mL⁻¹. These two algal densities were selected because it was shown in a previous study that they induced contrasting ventilatory behaviors [10], with the low algal density being a strong stimulus of ventilation. For each Se form (Se(+IV), Se(+VI) and SeMet), two algal densities and two Se algal burdens were tested (12 treatments). One control group per algal density was added. According to the results of the experiment described above, aiming at characterizing Se uptake in algae, two different waterborne Se concentrations were chosen : 200 and 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Algae pre-exposures were performed at the two concentrations of Se(+IV), Se(+VI) and SeMet, using the same protocol as this described in the former paragraph. Bivalves were then exposed to algal-bound selenium for 3 days. The ventilatory flow rate was measured individually 3 times a day (at 10 a.m., 1 p.m. and 4 p.m.) each day. At the end of the experiments, the tissular distribution of Se in the bivalves was also investigated for each treatment. The bivalves were stored for 2 weeks at -80°C before analysis. Samples of water were collected each day to check that Se concentration in the dissolved phase was not significant.

Analytical method to determine selenium concentrations

Total selenium concentration in samples was measured using the HG-QFAAS method (Hydride Generation - Quartz Furnace Atomic Absorption Spectrometry) [20] (FIAS-100 / AAS 4110-ZL, Perkin, CT USA). Two milliliters of a reagent mixture (H₂O₂/HNO₃, 1:1 v/v) were added to 1 mL of water or to the biological sample (aliquot of 1g of alga or clam soft tissue/organ) and heated at 100°C during 1.5 hour in a sealed system. This oxidation procedure yields mixtures of the oxidation states (+IV) and (+VI). Because HG-QFAAS only reaches selenite (Se(+IV)), a prerelution step of selenate (Se(+VI)) into selenite Se(+IV) is required. Reduction was realized in HCl 4 M heated for 45 minutes at 90 °C. In this selenite specific method, the aqueous sample (selenite) is introduced with HCl (10% v/v) into the hydride generator vessel. Then, the reducing agent (NaBH₄) is added and SeH₂ is formed from selenite. The volatile hydride is flushed by the carrier gas (argon) into a quartz cell (heated electrically) and atomized. Absorbance is measured at 196.0 nm using an electrodeless discharge lamp. Recording and treatment of the selenium signal are performed by an integrator. The detection limit is 0.04 µg·L⁻¹.

Ventilatory flow rates measurements and calculations

The ventilatory flow rate measurement was based on the determination of a volume of water cleared of algae per unit of time in a transiently closed system. During the clearance test periods, the peristaltic pumps were stopped, and the decrease in algal concentration which is directly proportional to the ventilatory activity, was measured. The density of algae was measured by means of a Coulter Z2 particle counter (Beckman Coulter, Roissy, France).

Jorgensen's equation [21] was used to calculate the ventilatory flow rate of the bivalve as follows:

$$\dot{V}_w = V \frac{[(\ln X_0 - \ln X_t) - (\ln X'_0 - \ln X'_t)]}{t \cdot m} \quad (2)$$

where, \dot{V}_w is the ventilatory flow rate (mL·h⁻¹·g⁻¹ f.w.) ; t is the test duration (h), which was systematically 0.25 hour ; m is the bivalve body mass (g f.w.) ; V is the volume of water in each chamber (mL), which was systematically 150 mL ; X_0 , X'_0 , the algal density at the beginning of the measurement (cells·mL⁻¹) in the test chamber and the reference (without any bivalve) respectively ; X_t , X'_t , the algal density at the end of the measurement (cells·mL⁻¹) in the test chamber and the reference one respectively.

It should be noted that four assumptions were associated to the use of equation 2 : the algal concentration in water was homogeneous, the decrease of algal concentration was only due to animal filtration, all algae passing over the gills were retained, and the ventilatory flow rate was constant throughout the test [22].

Based on the ventilatory flow rate determined during the experiment and the corresponding concentration of Se in algae, the total amount of Se that passed through the gills during the 3-day exposure period was estimated.

$$Q_u = [Se]_{particulate\ phase} \cdot 10^{-6} \cdot \dot{V}_w \cdot t \quad (3)$$

$$\text{with } [Se]_{particulate\ phase} = [Se]_{algae} \cdot X \quad (4)$$

where Q_u corresponds to the quantity of selenium passing through the animal during the 3-day exposure period (µg·g⁻¹ f.w.), $[Se]_{particulate\ phase}$ is the selenium concentration present in the

particulate phase of the water column ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$), with $[\text{Se}]_{\text{alga}}$ the mean concentration of selenium in algae ($\text{pg}\cdot(10^5 \text{ cells})^{-1}$) and X the mean algal density ($10^5 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$) during the experiment. \dot{V}_w is the mean ventilatory flow rate ($\text{mL}\cdot\text{h}\cdot\text{g}^{-1}$) during the experiment and t is the duration of the experiment, which was systematically 72 h. For these calculations we assumed that bivalves remained open all day.

Statistical Analysis

Linear and Michaelis-Menten models were applied to express the uptake flux in algae (SigmaPlot® 2001, SPSS Science, Chicago, IL, USA).

Results of bivalve's ventilation and bioaccumulation are given as arithmetic mean \pm 1 standard error. The statistical significance of treatment differences ($p \leq 0.05$) were evaluated using one-way analysis of variance ANOVA after checking assumptions of normality and homoscedasticity of error terms (SigmaStat® 2.0, SPSS Science, Chicago, IL, USA).

Linear regression were used to model total Se in bivalve as a function of total Se passing through the gills for each form of Se used (SigmaPlot® 2001, SPSS Science, Chicago, IL, USA).

Results and Discussion

Se uptake in *Chlamydomonas reinhardtii*

Results of selenium bioaccumulation ($\text{pg}\cdot(10^5 \text{ cells})^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) in *C. reinhardtii* are presented on figure 1. In the range of concentrations tested, each of the 3 selenium forms are accumulated by the algae, according to different patterns suggesting that each form may be taken up by different mechanisms. The most bioavailable form is the organic species selenomethionine followed by selenate and selenite. For instance, for the highest tested exposure concentration $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, Se uptake by the algae is 8 fold higher for the organic form SeMet than for the inorganic forms. For selenite ambient concentrations up to $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ the uptake is linear and no significant saturation pattern can be observed. The flux, corresponding to the slope of the curve, is $0.0102 \pm 0.0004 \text{ pg}\cdot(10^5 \text{ cells})^{-1}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. In the case of selenate and selenomethionine the uptake rate decrease significantly with increasing concentrations in the external medium. For these forms, Michaelis-Menten curves were fitted and the corresponding constants estimated. The maximum uptake rate V_m was estimated to $39.0 \pm 4.3 \text{ pg}\cdot(10^5 \text{ cells})^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, for selenate and $170 \pm 12 \text{ pg}\cdot(10^5 \text{ cells})^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, for selenomethionine. The half-saturation constant K_m was $998 \pm 236 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $110 \pm 42 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively for selenate and selenomethionine. The Michaelis Menten constants estimated indicate that in the case of selenomethionine, the transporters are more numerous and have a greater affinity than for selenate.

Riedel *et al* (1991) [23], observed that selenate and selenite uptake rates in *C. reinhardtii* increased linearly with concentrations up to $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and, on the other hand, they demonstrated that SeMet uptake was a biological process with saturable kinetics, saturation appearing from $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. They concluded that within the range of concentrations tested, selenate was transported into the cell by membrane transporters with low affinity and selenomethionine transported by a rapid, high affinity system. Incorporation of SeMet into proteins unspecifically as analog of methionine could explain the high Se content found in algae. For selenite, Morlon *et al.* (2005) [24] also demonstrated that the absorption was linear with time in a broad range of ambient concentrations, no statistical difference of uptake flux being observed between $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $4000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

These results show that the uptake fluxes are drastically different among inorganic and organic Se exposed algae. Thus, it was not possible to ensure a constant and accurate burden

of Se in the algae, that would be the same for the 3 selenium forms. As a consequence, the 2 extreme concentrations 200 and 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ were chosen for each form of Se to expose algae for the study of trophic transfer of Se to the bivalve.

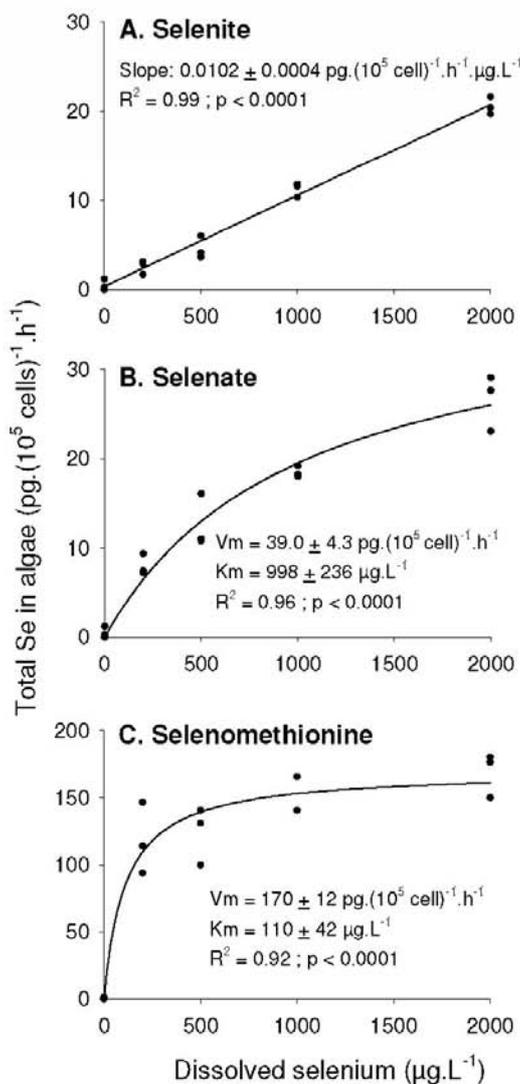


Figure 1: Selenium uptake by the freshwater algae *Chlamydomonas reinhardtii* as a function of waterborne selenium concentration after a one hour - exposure, at pH 7. A : Selenite ; B : Selenate ; C : Selenomethionine. The dots represent the experimental data (three replicates per concentration) and the line the modelled data. A linear relationship was fitted for selenite uptake and a Michaelis-Menten model for selenate and selenomethionine. K_m et V_m are the classical parameters of Michaelis-Menten equation (respectively the half-saturation constant and the maximal uptake rate).

Bivalve's ventilation during experiments

Ventilatory flow rate measurements are summarized in table 1. For the control group, we observed a significant difference of ventilation between bivalves exposed to low ($1\text{-}2\cdot 10^5$ cell·mL⁻¹) or high ($3\text{-}4\cdot 10^5$ cell·mL⁻¹) algal density, the lower algal density being a strong stimulus of ventilation. There is a factor 5 to 8 in the ventilation of the bivalves exposed to $1\text{-}2\cdot 10^5$ cell·mL⁻¹ and $3\text{-}4\cdot 10^5$ cell·mL⁻¹. These results fit correctly with those of Fournier *et al.* (2005) [11] and Tran *et al.* (2002) [10]. They observed strong increases in ventilation of *C. fluminea* for low algal density. Using the same artificial water and the same species, Fournier *et al.* (2005) [11] observed a factor 8 in the ventilation of the bivalves exposed to $1\text{-}2$ and $3\text{-}4\cdot 10^5$ cell·mL⁻¹. When bivalves were exposed to contaminated algae, whatever the form and concentration of Se, this ventilatory drive remained present (low algal density induced a mean ventilatory flow rate enhanced by a factor 2 to 8 in comparison with the ventilatory flow rate obtained with high algal density).

For a fixed algal density, no significant change in ventilation of *C. fluminea* was observed between the different contamination conditions.

A: Algal density of $1\text{-}2 \times 10^5$ cells·mL ⁻¹			
	Ambient Se concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Mean \dot{V}_w (mL·h ⁻¹ ·g ⁻¹ f.w.)	
		t_0	t_3
Control	0	426 ± 29	460 ± 65
Selenite	200	378 ± 53	428 ± 47
Selenite	2000	303 ± 51	366 ± 45
Selenate	200	335 ± 53	433 ± 62
Selenate	2000	481 ± 130	544 ± 97
SeMet	200	734 ± 136	681 ± 108
SeMet	2000	551 ± 89	679 ± 145

B: Algal density of $3\text{-}4 \times 10^5$ cells·mL ⁻¹			
	Ambient Se concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Mean \dot{V}_w (mL·h ⁻¹ ·g ⁻¹ f.w.)	
		t_0	t_3
Control	0	84 ± 11	54 ± 5
Selenite	200	75 ± 7	83 ± 8
Selenite	2000	53 ± 5	58 ± 8
Selenate	200	57 ± 6	78 ± 11
Selenate	2000	155 ± 31	264 ± 79
SeMet	200	78 ± 22	81 ± 14
SeMet	2000	129 ± 28	239 ± 49

Table 1. Mean ventilatory flow rate (mL·h⁻¹·g⁻¹ f.w.) of *C. fluminea* and associated standard error for 5 replicates during the 3-day exposure period to algal-bound selenium. Values are given before Se exposure (t_0) and after 3 days (t_3). Note that the control group is not exposed to selenium. A: at an algal density of $1\text{-}2 \times 10^5$ cells·mL⁻¹; B: at an algal density of $3\text{-}4 \times 10^5$ cells·mL⁻¹.

As regards the direct exposure pathway, two authors have shown that the presence of certain forms of dissolved Se could modify ventilation [11;16]. Fournier *et al.* (2005) [11] reported that selenite induced an increase in ventilation and SeMet a decrease, whereas

selenate did not induce any disturbance. These responses are thought to be early protection mechanisms. By the direct route, pollutants are directly in contact with gills and the response of bivalves can be a rapid process corresponding to an adaptative response. The pathway of dietary Se is obviously different. Ciliary currents of the gills carry particules in suspension towards the mouth and down to the oesophagus to be ingested. In this pathway, algal bound Se was obviously not detected by the bivalve chemoreceptors. A lot of pollutants have been reported to modify ventilation by the direct route (Hg, U, Se,...) but to our knowledge, there is no reference in literature on the study of modification of ventilation by contaminants brought by trophic route.

Se uptake in *Corbicula fluminea*

Results of mean bioaccumulation in the whole soft body of *C. fluminea* after a 3-day exposure period are presented on figure 2.

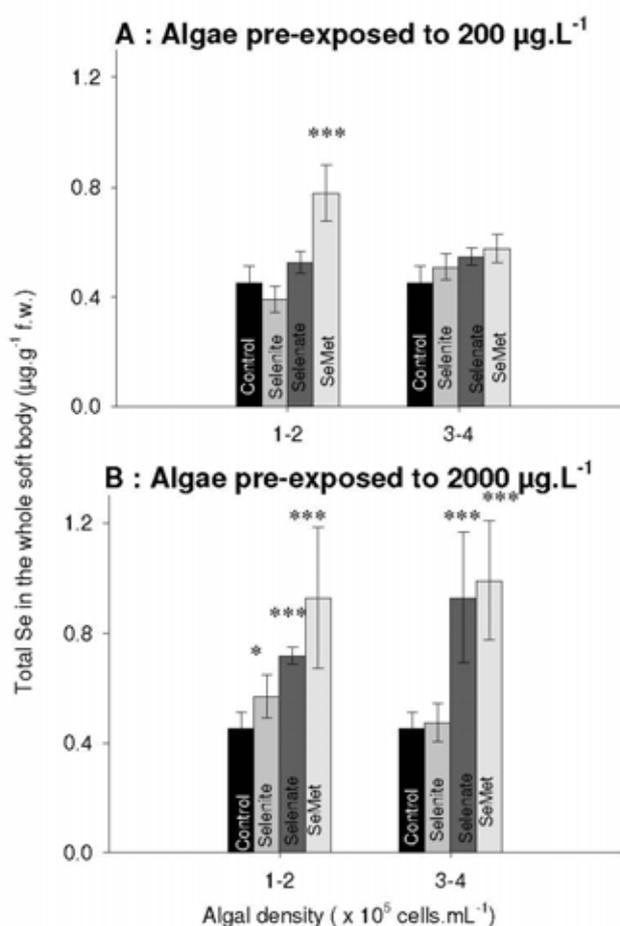


Figure 2 : Total Se in the whole body of *Corbicula fluminea* ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ f.w.) after a 3 day-exposure period, as a function of the algal density and of the Se forms used for algae pre-exposure. A : Algae pre-exposed to $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, B : Algae pre-exposed to $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Asterisks indicate values statistically different from the control (t test, * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$). Mean value \pm 1 standard deviation ($n = 5$).

For the bivalves exposed to algae contaminated at $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (fig 2A), there was no significant bioaccumulation of Se whatever the algal density excepted for the group fed with algae exposed to SeMet at the algal density of $1\text{-}2\cdot 10^5 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$. On the other hand, bivalves exposed to algae pre-exposed to $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ accumulated Se significantly whatever the algal density and the form of Se used for the algal pre-exposure. A slight effect of dose appeared between bivalves submitted to algae pre-exposed to $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. No significant effect of algal density on Se bioaccumulation in bivalves could be observed even though the animals displayed different ventilatory behaviors (except for bivalves exposed to $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of SeMet). This suggests that the adjustment of the ventilatory flow rate by the animal to maintain the same consumption of food whatever the algal density resulted in the same dietary Se quantity passing through gills. However, for the condition $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of SeMet where bivalves accumulated more Se at low algal density, the algal input flux passing through the gills was higher ($1022 \times (10^5 \text{ cells})^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ at low algal density and $284 \times (10^5 \text{ cells})^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ at high algal density). This could explain the differences in bioaccumulation observed for these two conditions. The results show also that there is an effect of the form of Se used for algae pre-exposure on bivalves' Se accumulation. Differences in Se uptake between the different groups of bivalves could be then explained by i) the total quantity of Se accumulated in algae that changed according to the Se form used, and gave rise to the concentration of Se in algae ; ii) the algal density ; iii) the animal ventilation (figure 3).

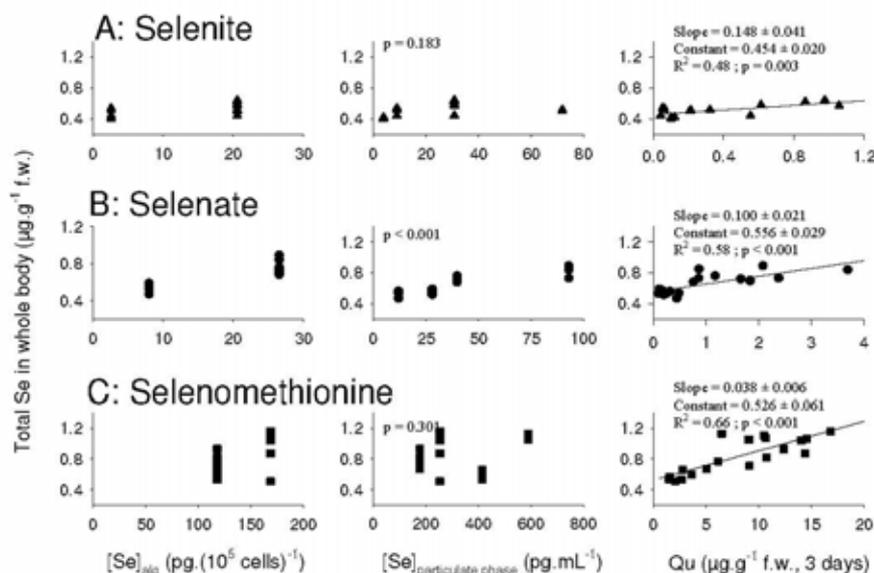


Figure 3: Total Se in the whole soft body of *Corbicula fluminea* ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ f.w.}$) after a 3 day-exposure period as a function of the concentration of Se in algae ($\text{pg}\cdot(10^5 \text{ cells})^{-1}$), the concentration of Se in the particulate phase of the water column ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and the total quantity of Se passing through gills ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ f.w.}$). A: Algae pre-exposed to selenite (200 and $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), B: Algae pre-exposed to selenate (200 and $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), C: Algae pre-exposed to selenomethionine (200 and $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). The dots represent the experimental data and the line the modelled data (linear regression with a constant term, where the constant represents the natural background of Se in the soft tissues).

Consequently, and in attempt to outline the contribution of the 3 key-factors for each form of Se, in figure 3, bioaccumulation in the whole soft body of *C. fluminea* is presented first, as a function of the total concentration of Se in algae. Secondly it is presented as a

function of the concentration of Se in the particulate phase of the water column taking into account the algal density. Finally, it is plotted as a function of the total quantity of Se passing through the gills, i.e. taking into account ventilatory activity. For that purpose, the quantity of Se passing through the gills, was calculated for each bivalve according to the equation 3, taking into account the ventilation of each bivalve, the total concentration of Se in algal and the mean algal density during each experiment. This new approach allows to take into account the physiological status of the bivalve, which is often forgotten. Figure 3 shows that the bioaccumulation in the whole soft body of bivalves as a function of total concentration of Se in algae or in the particulate phase exhibits a poor correlation. To the contrary, the correlation between accumulation in the whole soft body and the total Se quantity passing through gills was rather good (linear regressions with $p = 0.003$, $p < 0.001$ and $p < 0.001$ for selenite, selenate and selenomethionine respectively). For each form of Se used, we can observe a linear relationship between total Se passing through gills and total bioaccumulation in the whole body. As we did not measure the Se quantity in the clam's soft body after a depuration phase corresponding to the digestive tract clearance, this linearity could be due to the Se not completely metabolized in the digestive tract of the bivalve. However, the quantity of algal-bound Se still remaining in the digestive tract that would lead to a significant and detectable quantity of Se in bivalves ($0.1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ f.w.), would correspond to a huge number of algal cells (about 10^9 cells for inorganic forms and about 10^8 cells for organic forms. Consequently, to avoid this problem of digestive tract clearance, the bioaccumulation of Se is also presented in the gills, a largely vascularised organ that represents the global flux of Se in the bivalve (figure 4). The same method as on figure 3 is used, by representing the uptake in function of the 3 key factors identified. A significant linear relationship can be estimated for selenite ($p = 0.005$) and selenomethionine ($p < 0.001$) exposed groups.

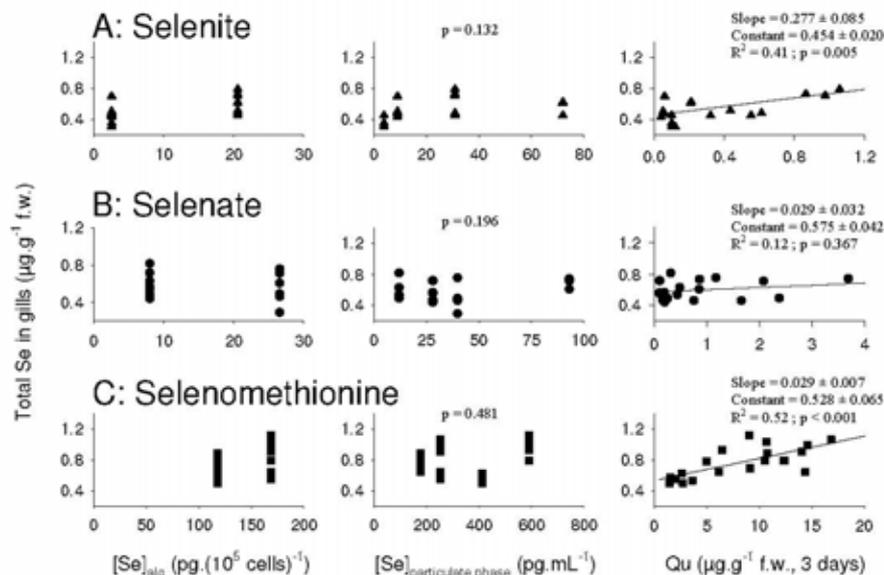


Figure 4: Total Se in gills of *Corbicula fluminea* ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ f.w.) as a function of the concentration of Se in algae ($\text{pg}\cdot(10^5 \text{ cells})^{-1}$), the concentration of Se in the particulate phase of the water column ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and the total quantity of Se passing through gills ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ f.w.). A : Algae pre-exposed to selenite (200 and $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), B : Algae pre-exposed to selenate (200 and $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), C : Algae pre-exposed to selenomethionine (200 and $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). The dots represent the experimental data and the line the modelled data (linear regression with a constant term, where the constant represents the natural background of Se in the soft tissues).

The linearity of the response between Se in the bivalve and Se quantity circulating through the gills (fig 3) underlines again the importance of algal density and ventilation in Se bioaccumulation processes by the trophic route. However, Se form used for algal diet preparation is still a key factor since the slope of the linear regressions which corresponds to the average assimilation efficiency over the three days of experiment differ among inorganic and organic forms (0.148 ± 0.041 ; 0.100 ± 0.020 ; 0.038 ± 0.006 for selenite, selenate and SeMet respectively). The slopes estimated for selenite and selenate are not significantly different and are higher than for the organic form. Different hypotheses can be put forward :

- i) different biotransformations of inorganic and organic Se in algal diet, providing different bioavailability of algal-bound Se
- ii) different bioaccumulation processes as a function of the concentration of Se in food, which is lower for the inorganic forms than for SeMet (the range of Q_u goes from 0.1 to $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ f.w. for Se(+IV) and Se(+VI) and from 2 to $17 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ f.w. for SeMet). Thus, a saturation of Se uptake could occur, similarly to the saturation observed earlier for SeMet in the algae.

The current understanding of the biochemical cycle of selenium in freshwaters clearly underlines the role of biotransformations by aquatic primary producers of dissolved Se oxyanions Se(+IV) and Se(+VI) into organo-selenium form and Se(0). Once accumulated in these cells, Se can be transferred to algal consumers such as bivalves. The results presented here underline the importance of investigating the biotransformations of contaminant in the organisms to better understand their bioavailability throughout trophic transfers. This implies also a better knowledge of the predation and digestion processes in the predator organisms.

Bioavailability and distribution of Se in the organisms depend largely on the chemical form in the diet [25]. No data concerning the speciation of selenium in *C. reinhardtii* was found in the literature. It was shown for cereals and microorganisms that they are able to convert Se mainly in SeMet. In *Saccharomyces cerevisiae*, 90% of Se is in the form of SeMet [26]. Biotransformations and microlocalisation (cytoplasmic and non-cytoplasmic i.e. membranes and organelles) of Se in the food, but also transformations of Se once assimilated by *C. fluminea*, may explain the bioavailability of Se by the trophic route. Reinfelder *et al.* (1997) [27] demonstrated that assimilation of phytoplankton-associated trace elements (including Se) by four marine bivalves was often directly related to the proportion of trace elements in the cytoplasm fraction of ingested algal cells. But they also found that 3 of them could assimilate Cd and Ag (about 36 %) associated with non-cytoplasmic fraction in addition to the cytoplasmic fraction. Other authors demonstrated that the dependency of the assimilation efficiencies on the distribution of metals in the cytosolic fraction of cells is variable among metals and species. Schlekat *et al.* (2002) [28] studied assimilation of Se from phytoplankton by 3 benthic invertebrates. No relationship was observed between the proportion of Se in algal cell cytoplasm and Se assimilation efficiency by the amphipod *L. phumulosus*. On the other hand, Se assimilation efficiencies by the bivalve *M. balthica*, varied according to the proportion of cytoplasmic Se in algal cells. The bivalve *P. amurensis* assimilated non cytoplasmic Se from phytoplankton, perhaps through the use of the glandular digestive pathway. They concluded that internal feeding mechanisms could play an important role in the differences observed between Se assimilation efficiencies and cytoplasmic Se for the different particle feeders. Filter feeding bivalves use dual digestive pathways in which easily digestible material (soluble organic material, algal cell cytoplasm) is processed by extracellular enzyme in the intestine, whereas more recalcitrant material (particulate material, bacterial cells) is phagocitized within the digestive gland. Exposure to trace elements that penetrate algal cell cytoplasm will be greater for those bivalves that selectively ingest algal

cell cytoplasm from suspended particles, compared with those that do not exhibit selective feeding. This selectivity may result in different accumulation patterns among bivalves.

Conclusions

In the experimental conditions tested, present data demonstrates that the bioaccumulation of Se depends on the total quantity of Se passing through the bivalve's gills. More precisely, one can say that it depends on : i) the quantity of Se bioaccumulated in algae, which clearly depends on speciation in the exposure medium ; ii) the animal's ventilation rate, which clearly depends on algal density. Thus these results stress the importance of both physiological factors and chemical speciation to properly understand and analyze bioaccumulation of Se, and possibly other metals, in bivalves. Other investigations concerning distribution and speciation of Se into biological tissues are going on and will permit us to know how selenium is transformed in *C. reinhardtii cells* and what are the key forms involved in the trophic transfer of Se.

Acknowledgement

We thank V. Camilleri and S. Lalande for their technical assistance. This work is part of the ENVIRHOM program funded by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety.

References

- [1] Lemly AD. 2004. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotox Environ Safe* 59: 44-56.
- [2] Conde JE, Sanz Alaejos M. 1997. Selenium concentrations in natural and environmental waters. *Chem Rev* 97:1979-2002.
- [3] Wu L. 1994. Selenium accumulation and colonization of plants in soils with elevated selenium and salinity. In *Selenium in the environment*, Frankenberger: 104:981-987.
- [4] Robberecht H, Van Grieken R. 1982. Selenium in environmental waters : Determination, speciation and concentration levels. *Talanta* 29:823-844.
- [5] Fan TW-M, The SJ, Hinton DE, Higashi RM. 2002. Selenium biotransformations into proteinaceous forms by foodweb organisms of selenium-laden drainage waters in California. *Aquat Toxicol* 57:65-84.
- [6] Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. 2003. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother* 57:134-144.
- [7] Price NM, Thompson PA, Harrison PJ. 1987. Selenium ; an essential element for growth of the coastal marine diatom *Thalassosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 23:1-9.
- [8] Wachowicz B, Zbikowska HM, Nowak P. 2001. Selenium compounds in the environment; their effect on human health. *Cellular and Molecular Biology Letters* 6:375-381.

- [9] Zhang GH, Hu MH, Huang YP. 1990. Se uptake and accumulation in marine phytoplankton and transfer of Se to the clam *Puditapes philippinarum*. *Mar Environ Res* 30:179-190.
- [10] Tran D, Boudou A, Massabuau JC. 2002. Relationship between feeding-induced ventilatory activity and bioaccumulation of dissolved and algal-bound cadmium in the asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Environ Toxicol Chem* 21:327-333.
- [11] Fournier E, Adam C, Massabuau JC, Garnier-Laplace J. 2005. Bioaccumulation of waterborne selenium in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* : influence of feeding-induced ventilatory activity and selenium species. *Aquat Toxicol* 72:251-260.
- [12] Fournier E, Tran D, Denison F, Massabuau JC, Garnier-Laplace J. 2004. Valve Closure Response to Uranium Exposure for a Freshwater Bivalve *Corbicula fluminea*: Quantification of the Influence of pH. *Environ Toxicol Chem* 23:1108-1114.
- [13] Tran D, Ciret P, Ciutat A, Durrieu G, Massabuau JC. 2003. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants : Application to cadmium. *Environ Toxicol Chem* 22:914-920.
- [14] Tran D, Fournier E, Durrieu G, Massabuau JC. 2004. Copper detection in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* : Optimum valve closure response. *Aquat Toxicol* 66:333-343.
- [15] Tran D, Massabuau JC, Garnier-Laplace J. 2004b. The effect of carbon dioxide on uranium bioaccumulation in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Environ Toxicol Chem* 23:739-747.
- [16] Watling HR, Watling RJ. 1982. Comparative Effects of Metals on the Filtering Rate of the Brown Mussel (*Perna perna*). *Bull Environm Contam Toxicol* 29:651-657.
- [17] Macfie SM, Tarmohamed Y, Welbourn PM. 1994. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* : The influence of the cell wall and pH. *Arch Environ Contam Toxicol* 27:454-458.
- [18] Smith EJ, Davison W, Hamilton-Taylor J. 2002. Methods for preparing synthetic freshwaters. *Water Res* 36:1286-1296.
- [19] Massabuau JC. 2001. From low arterial- to low tissue-oxygenation strategy. An evolutionary theory. *Respir Physiol* 128:249-261.
- [20] Gleyzes C, Seby F, Lespes G, Potin-Gautier M. 1997. Validation of the inorganic selenium speciation by the HG-QFAAS method using experimental design. *Analyst* 25:273-278.
- [21] Coughlan J. 1969. The estimation of filtering rate from clearance of suspension. *Mar Biol* 2: 356-358.

- [22] Tran D, Boudou A, Massabuau JC. 2000. Mechanism for maintaining oxygen consumption under varying oxygenation levels in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Can J Zool* 78:2027-2036.
- [23] Riedel FG, Ferrier DP, Sanders JG. 1991. Uptake of selenium by freshwater phytoplankton. *Water, Air and Soil Pollution* 57-58:23-30.
- [24] Morlon H. 2005. Mécanismes de prise en charge du sélénite –Se(IV) chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Bioaccumulation et effets induits sur la croissance et l'ultrastructure. Université Bordeaux1, France.
- [25] Whanger PD. 2002 Selenocompounds in Plants and animals and their Biological Significance. *Journal of the American College of Nutrition* 20:223-232.
- [26] Schrauzer GN. 2000 Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *Journal of Nutrition* 7: 1653-6.
- [27] Reinfelder JR, Wang WX, Luoma NS, Fisher NS 1997. Assimilation efficiencies and turnover rates of trace elements in marine bivalve: a comparison of oysters, clams and mussels. *Mar Biol* 129:443-452.
- [28] Schlekot CE, Byeong-Gweon Lee, Luoma SN. 2002. Assimilation of selenium from phytoplankton by three benthic invertebrates: effect of phytoplankton species. *Mar Ecol Prog ser* 237:79-85.

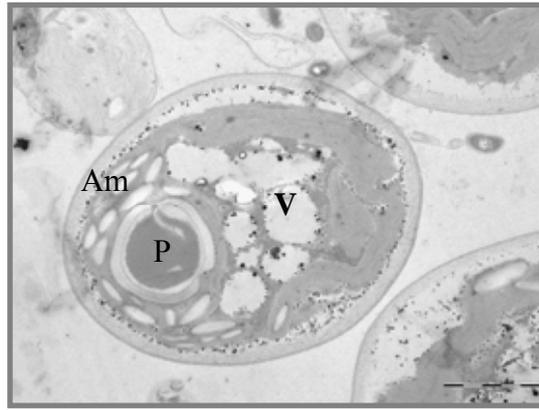


Figure 21 : Image de *Chlamydomonas reinhardtii* obtenue au MET. P : pyrénôïde; V : vacuole; Am : Amidon

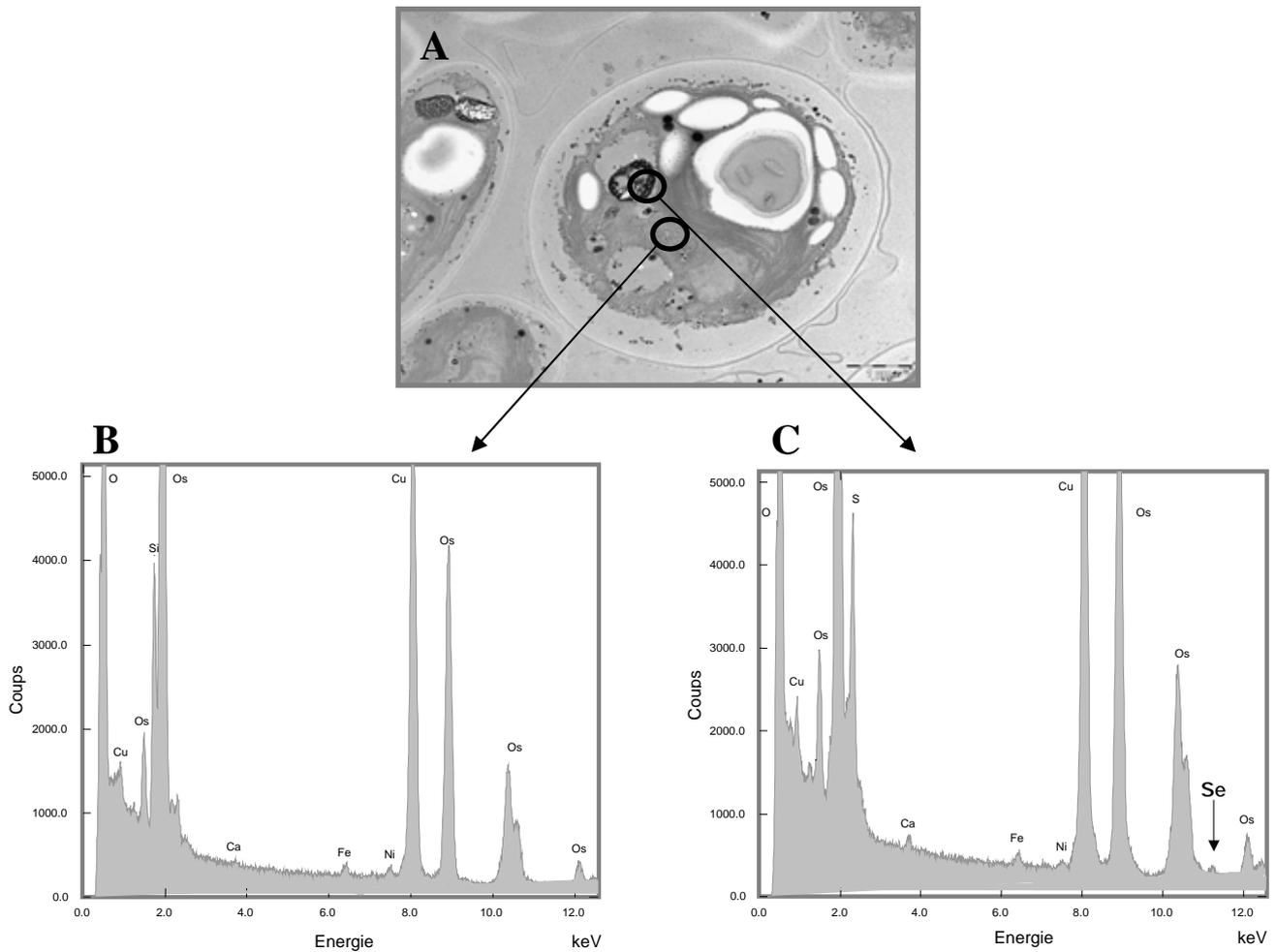


Figure 22 : A : Image de *C. reinhardtii* exposé 1 h à $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sélénite ; B : spectre associé au cytosol ; C : spectre associé aux vacuoles granuleuses.

4.1.2.3. Principales avancées et conclusions

Le but des recherches présentées dans ce paragraphe était d'acquérir des données relatives aux paramètres physiologiques et environnementaux pouvant moduler la biodisponibilité du sélénium apporté par la voie trophique. Les avancées obtenues s'articulent en deux axes, la bioaccumulation chez l'organisme source, l'algue verte unicellulaire *C. reinhardtii*, et chez l'organisme cible, le bivalve filtreur *C. fluminea*.

a) Bioaccumulation du sélénium chez l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*

Nous avons montré que le sélénium s'accumulait dans les algues de manière différente selon les formes chimiques utilisées. Nous avons montré une saturation des taux d'accumulation pour le séléniate et la SeMet et une linéarité pour le sélénite pour des concentrations allant jusqu'à $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Ceci laisse suggérer des mécanismes de transport différents. Dans le cas de la SeMet, les transporteurs seraient plus nombreux et auraient une plus forte affinité que dans le cas du séléniate. En accord avec nos résultats, Riedel *et al.* (1991), montrent que le séléniate est transporté chez *C. reinhardtii* par des transporteurs de faible affinité et que la SeMet est transportée par un système rapide de forte affinité.

Ces résultats peuvent être complétés par les observations d'algues au MET couplé à la sonde X, qui n'ont pas été rapportés dans l'article. Ces études sont préliminaires puisque basées sur une seule série d'expériences, mais permettent d'émettre des hypothèses sur la bioaccumulation du sélénium au sein des cellules algales et sur la biodisponibilité du sélénium internalisé lors du transfert trophique. Les observations ont été faites pour les algues exposées à la condition d'exposition de 1 heure à $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, ainsi qu'à une condition d'exposition plus marquée, de 48 heures à $10000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ permettant de confirmer les tendances observées. Les principales informations tirées de ces observations sont des localisations différentes du sélénium entre les algues contaminées avec du Se inorganique et les algues contaminées avec du Se organique. Lorsque les algues ont été exposées à du sélénite ou du séléniate, le sélénium a uniquement été retrouvé au niveau de vacuoles granuleuses (Figure 22). Ceci avait déjà été observé par Morlon *et al.* (2005), après une exposition à du sélénite.

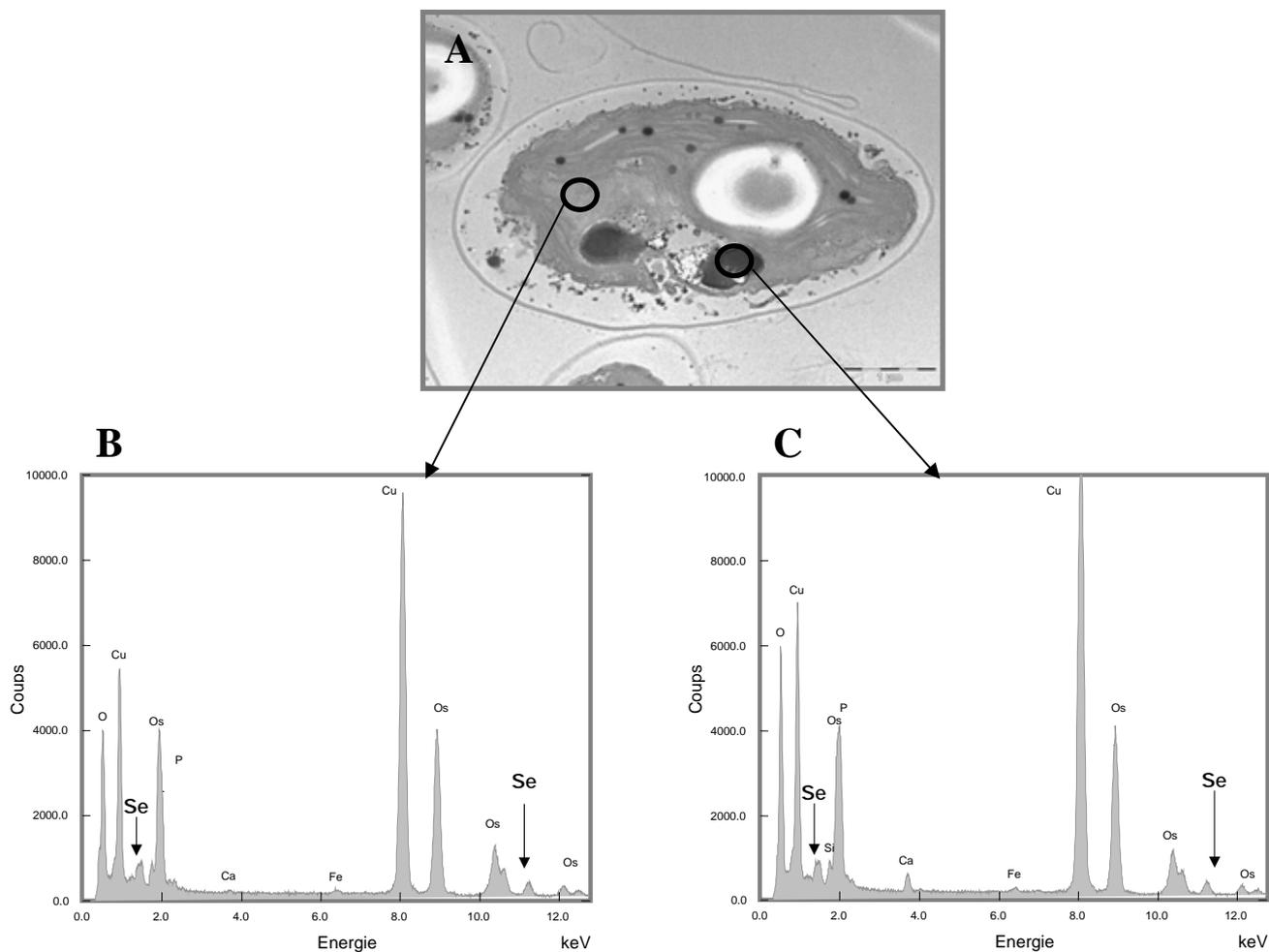


Figure 23 : A : Image de *C. reinhardtii* exposé 1 h à $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de SeMet ; B : spectre associé au cytosol ; C : spectre associé aux vacuoles granuleuses.

Par contre, lorsque les algues ont été exposées à de la SeMet, le sélénium a été retrouvé dans toutes les parties de l'algue (vacuoles et cytosol inclus) (Figure 23). Pour expliquer cette large distribution de la SeMet dans la cellule algale, l'hypothèse d'une incorporation aspécifique dans de nombreuses protéines peut être émise. De plus, ceci pourrait indiquer un transfert trophique de la SeMet beaucoup plus important que celui des formes inorganiques. En effet, les métaux/métalloïdes présents dans la fraction cytosolique des algues ingérées sont généralement plus assimilables que ceux de la fraction granulaire (Wallace et Luoma, 2003).

b) Bioaccumulation du sélénium par la voie trophique : rôle de la ventilation du bivalve et de la spéciation du sélénium

Conformément aux résultats présentés précédemment nous avons observé une différence de débit ventilatoire entre bivalves exposés à faible et à forte densité d'algues. Ceci reste vrai pour les bivalves exposés à des algues contaminées en Se quelle que soit la forme de Se utilisée pour la contamination des algues. Pour une densité d'algues donnée, le sélénium apporté par la voie trophique ne modifie pas le débit ventilatoire de *C. fluminea*, quelle que soit la dose ou la forme de Se utilisée.

Pour chaque condition d'exposition au Se, il n'y a pas de différence significative d'accumulation du sélénium chez les bivalves exposés à faible ou à forte densité d'algues contaminées, alors qu'ils ont des débits ventilatoires distincts. Ces différents débits ventilatoires tendent à procurer aux bivalves une prise alimentaire constante. L'ajustement du débit ventilatoire de *C. fluminea* face à l'apport trophique fait qu'il ne se contamine pas plus en présence d'une grande quantité qu'en présence d'une faible quantité d'algues contaminées. En revanche, en fonction de la forme de Se utilisée pour la pré-exposition des algues, les bivalves n'accumulent pas le sélénium dans les mêmes proportions. Plusieurs facteurs peuvent intervenir dans ces phénomènes : la concentration totale de Se dans l'algue (liée à la spéciation) et la quantité d'algues prises en charge par le bivalve (liée à la ventilation).

Les résultats indiquent que par la voie trophique, et pour chaque forme de Se étudiée, la bioaccumulation du sélénium dans le corps mou de *C. fluminea* est proportionnelle à la quantité totale de Se passant par les branchies. Cette dernière est fonction de la concentration totale de Se dans l'algue et de la quantité d'algues prises en charge par le bivalve. Ainsi, la prise en compte conjointe des facteurs ventilation du bivalve et spéciation du sélénium semble essentielle pour comprendre la bioaccumulation par la voie trophique.

Le coefficient d'extraction du sélénium par le bivalve semble plus important lorsque les algues sont pré-exposées à des formes inorganiques de Se. Plusieurs hypothèses s'offrent à nous :

- Les biotransformations des formes organiques et inorganiques de Se dans l'algue sont différentes. Elles conduisent à des biodisponibilités différentes du sélénium incorporé dans les algues pour le bivalve.
- Le sélénium est localisé dans des structures cellulaires différentes selon les formes de Se (ceci a été vue de manière indirecte par la localisation au MET), ce qui le rend plus ou moins accessible lors du transfert trophique. Ceci est à mettre en liaison avec les processus digestifs propres à chaque espèce.
- Les processus de bioaccumulation diffèrent en fonction de la concentration de Se dans la nourriture, qui est plus faible pour les formes inorganiques que pour la SeMet. On pourrait avoir une saturation de l'accumulation du sélénium.

D'une manière générale, ces résultats indiquent donc bien la nécessité de prendre en compte les facteurs environnementaux tels que la densité d'algues ou la forme chimique des polluants et les facteurs physiologiques, tels que le débit ventilatoire pour comprendre le transfert trophique du sélénium chez un modèle bivalve. En outre, la connaissance des processus digestifs est indispensable.

4.1.3. Comparaison de la bioaccumulation du sélénium par la voie directe et par la voie trophique

4.1.3.1. Introduction :

Les principales avancées concernant les effets du sélénium sur la ventilation et les facteurs impliqués dans les processus de bioaccumulation du sélénium apporté par les voies directe et trophique chez *C. fluminea* ont ici été résumées :

- Effets des facteurs environnementaux sur la ventilation du bivalve :
 - i. L'apport trophique peut modifier le comportement ventilatoire de *C. fluminea*.
 - ii. Par la voie directe, le sélénium peut modifier la ventilation de *C. fluminea* et ceci est largement dépendant des formes de Se étudiées. Le sélénite stimule la ventilation, la SeMet l'inhibe et le séléniate ne la modifie pas.
 - iii. Par la voie trophique, le sélénium ne modifie pas le débit ventilatoire de *C. fluminea*.

- Facteurs impliqués dans la bioaccumulation du sélénium chez le bivalve :
 - i. Par la voie directe, la spéciation conditionne la bioaccumulation. La SeMet est la forme la plus bioaccumulée suivie du séléniate et sélénite. Aux concentrations testées, la ventilation du bivalve n'a pas d'impact sur les processus d'accumulation par la voie directe.
 - ii. Par la voie trophique, l'accumulation du sélénium est proportionnelle à la quantité totale de Se qui passe par les branchies. Cette dernière dépend de la concentration de Se total dans les algues, la quantité d'algues dans le milieu et le débit ventilatoire des bivalves. La ventilation du bivalve mais aussi la spéciation du sélénium semblent donc essentielles pour expliquer la bioaccumulation du sélénium par la voie trophique chez *C. fluminea*.

L'ensemble des résultats obtenus par les voies directe et trophique a été résumé dans l'article suivant. Puis ils seront discutés en termes d'efficacité d'extraction.

4.1.3.2. Article : “*Effect of selenium exposure on the freshwater bivalve Corbicula fluminea.*” Fournier E, Adam C, Massabuau JC, and Garnier-Laplace J. *Radioprotection* 40 : S3-S9.

Effect of selenium exposure on the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*

E. Fournier¹, C. Adam¹, J.C. Massabuau² and J. Garnier-Laplace¹

¹Laboratoire de Radioécologie et d'Écotoxicologie, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, DEI/SECRE/LRE, Cadarache, Bât. 186, BP. 3, 13115 St-Paul-lez-Durance Cedex, France

²UMR 5805, Laboratoire d'Écophysiologie et Écotoxicologie des Systèmes Aquatiques, Université Bordeaux 1 et CNRS, Place du Dr. Peyneau, 33120 Arcachon, France

Abstract. Selenium is essential for most of living organisms. In normoxic to moderately hypoxic freshwaters, Se exists predominantly in the (+VI) and (+IV) oxidation states as selenate and selenite respectively, whereas in the biota it is incorporated as Se (-II) or Se (0). At low concentrations, it acts against oxidative damages, but it may be toxic at higher levels. In filter feeders, such as the freshwater bivalve *Corbicula fluminea*, the ventilatory activity is a primary limiting step that controls the water influx and therefore the delivery of contaminants. A number of different parameters such as algal food density or presence of contaminant can influence the ventilation and hence the bioaccumulation potential of the contaminant. We report here a set of short-term experiments performed to study the effects of different forms of dissolved Se (selenite, selenate, selenomethionine) and algal-bound Se on the ventilatory activity of *Corbicula fluminea* and to evaluate the Se bioaccumulation. All experiments were performed on a 3-day exposure period after acclimatizing the organisms during a 7-day period to the synthetic water, at a regulated algal density. Both bioaccumulation and ventilatory activity of Se exposed groups, in comparison to these of the reference group, varied greatly according to the form of Se used.

1. INTRODUCTION

Selenium is a naturally occurring trace element acting as an essential micronutrient for living animal organisms. Typical concentrations in unpolluted freshwaters (0.2 µg/L) may be increased in connection with various anthropogenic sources [1]. It exists in surface waters mainly as the high soluble selenite Se(+IV) (SeO₃²⁻) and as selenate Se(+VI) (SeO₄²⁻). Organic selenides, Se(-II) (including Se-amino-acids and Se-proteins) are produced by biological reduction of selenite and usually occur at lower concentrations in water than inorganic Se species. However, seleno-amino-acids exhibit a greater bioavailability than inorganic species [2-3]. In most of living organisms Se acts against oxidative damages in the form of the glutathione peroxydase (Gpx) but also as other selenoproteins, e.g. selenoprotein P and thioredoxin reductase [4]. Selenium toxicity can occur due to its chemical analogy with sulphur. Development abnormalities and reproductive failure have been observed in fish after trophic contamination [5].

Bivalves are widely used as bioindicators of aquatic pollution, using their ability to accumulate contaminants, such as trace metals, in their tissues [6-7]. Metals can be accumulated through both direct uptake from the dissolved phase and ingestion from the particulate phase. Various studies have demonstrated that food quantity and quality [8-9] and the presence of waterborne metals such as Hg, Se [10] or U [11] can modify the bivalve's ventilation. Ventilation is the primary limiting step that controls the water influx and therefore, the delivery of contaminants into the branchial cavities. These studies have shown that metal bioavailability is not only linked to the aqueous metal speciation, but also to the bivalve respiratory physiology that is closely dependent on environmental factors.

The study presented here is part of a wider research program whose aim is to characterize Se bioavailability and effects in *C. fluminea*, as a function of various physiological and environmental factors. Short-term experiments have been performed to determine the bioavailability and the effect of dissolved and algal-bound Se on the ventilatory flow rate of the widespread bivalve *C. fluminea*. Three main oxidative states were tested. In a first set of experiments, Se was added into the water as three different chemical forms each corresponding to an oxidation state: the two inorganic compounds Se(+VI) and Se(+IV), and the seleno-L-methionine Se(-II) which is the predominant form of Se organic compounds in tissues of plants and algae [12-13]. In a second set of experiments, Se was added by the trophic route *via* algae pre-exposed to the three different chemical forms of Se.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals collection and maintenance

C. fluminea specimens (0.90 ± 0.05 g fw for the whole soft body) were collected manually from river Saint-Seurin-sur l'Isle (France). They were maintained at 20°C, in a polyvinyl chloride tank filled with dechlorinated tap water over washed quartz sand. Animals were fed daily with a suspension of the unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii*. Half the volume of water was changed once a week.

2.2 Physico-chemical parameters

Experiments were performed in polypropylene beakers (5 x 5 x 8 cm) filled with a synthetic water (Ca²⁺ 290 µM; Mg²⁺ 195 µM; Na⁺ 500 µM; K⁺ 165 µM; Cl⁻ 882 µM; SO₄²⁻ 100 µM; NO₃⁻ 500 µM; CO₃⁻ 24 µM; PO₄³⁻ 5 µM, pH 7.0 at equilibrium) over washed quartz sand. The experiments were performed at 20.0 ± 0.5 °C. The pH was regulated at 7.0 ± 0.1 by the addition of NaOH using a pH-stat. Organisms were maintained under a 14 h light – 10 h dark photoperiod. Air was bubbled continuously into the tanks to ensure algal mixing, gas-water equilibration and to keep constant the respiratory status of the bivalves. The ionic composition of the water and the algal cell supply were maintained constant using peristaltic pumps under flow-through conditions. During the experiments, the animals were isolated from external vibrations in the laboratory using an antivibrating bench.

2.3 Exposure protocol

The bioavailability of Se *via* the direct or trophic routes and its effect on the ventilation were studied. These experiments were carried out at 2 different algal densities (1-2 x 10⁵ and 3-4 x 10⁵ cells/mL) in order to investigate the impact of food availability on the ventilation. After acclimating organisms (5 replicates of one individual per beaker) during a 7-day period to the synthetic water and the selected algal density (acclimation period), animals were either exposed for 3 days to dissolved Se: selenite, selenate or seleno-L-methionine at 50 µg/L or to algal bound Se (algae pre-exposed to 2000 µg/L of selenite; selenate or selenomethionine for 1 hr). The ventilatory flow rate of each bivalve was also estimated 3 times a day according to the Jorgensen's equation [14]:

$$\dot{V}w = V \cdot [(\ln X_0 - \ln X_t) - (\ln X'_0 - \ln X'_t)] / (t \cdot m) \quad (1)$$

where, $\dot{V}w$ is the ventilatory flow rate (mL/hr/g fw); t is the test duration (hr); m is the bivalve body mass (g fw); V is the volume of water in each chamber (mL); X_0, X'_0 , the algal density at the beginning of the measurement (cells/mL), in the test chamber and the reference one (without any bivalve) respectively; X_t, X'_t , the algal density at the end of the measurement (cells/mL) in the test chamber and the reference one respectively.

Based on the ventilatory flow rate determined during the experiment and the corresponding concentration of Se in the water column and/or in the algae, we estimated the total amount of Se that passed through the gills during the 3-day exposure period.

$$Q = [Se] \cdot \dot{V}_w \cdot t \quad (2)$$

where Q corresponds to the quantity of selenium passing through the animal gills ($\mu\text{g/g fw}$), [Se] is the total selenium concentration in the water column (dissolved and/or algal bound ($\mu\text{g/L}$)), \dot{V}_w is the ventilatory flow rate (L/hr/g fw) and t is the duration of the experiment (hr). These calculations were performed on the basis assumption that the bivalves stayed open throughout the exposure phase.

Se quantification in the biological samples and in water was performed using the HG-QFAAS method (Hydride Generation - Quartz Furnace Atomic Absorption Spectrometry) [15].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Effect of selenium on the ventilatory flow rate of *C. fluminea*

3.1.1 Direct route

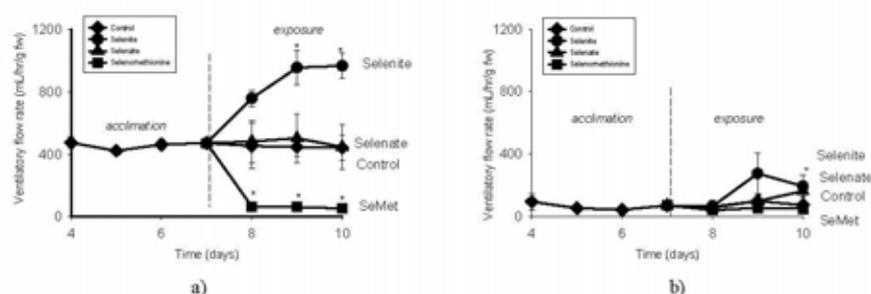


Figure 1. Changes in the ventilatory flow rate (mL/hr/g fw) of *C. fluminea*, as a function of time (days). A 7-day acclimation phase was followed by a 3-day exposure period (3 dissolved selenium forms tested at $50 \mu\text{g/L}$), at two different algal densities: A: $1-2 \times 10^5$ cells/mL and B: $3-4 \times 10^5$ cells/mL. Asterisks indicate values significantly different from that characterizing the control (Anova, $p \leq 0.05$).

Figure 1 reports the ventilatory flow rate as a function of time. Whatever the conditions, bivalve ventilation reached a steady state during the acclimation period. At the low algal density ($1-2 \times 10^5$ cells/mL), the control group had a constant high ventilatory flow rate of about $400-500 \text{ mL/hr/g fw}$ during all the experiment, whereas at the high algal density ($3-4 \times 10^5$ cells/mL), the control group had a constant low ventilatory flow rate of about $50-100 \text{ mL/hr/g fw}$. A low algal density induces a strong ventilation, which allows to compensate the lack of food in the milieu. This pattern has already been reported for *C. fluminea* by Tran et al. [9]. They observed a stimulation of ventilation for algal densities less than $1-2 \times 10^5$ cells/mL at 15°C , whereas, at 25°C the stimulation occurred for densities below $4-5 \times 10^5$ cells/mL. At low algal concentration, the addition of $50 \mu\text{g/L}$ of selenomethionine induced a strong decrease in the ventilatory activity of *Corbicula fluminea* compared to that of the control group. Changes in the respiratory physiology (ventilation activity and/or valve movement) of *C. fluminea* have already been shown after addition of other metals, both essential or not essential [11;16-18]. In response to toxic components (such as Hg or U) bivalves often decrease their ventilatory activity as a protective mechanism. As selenomethionine (SeMet) is known to be very

toxic (96h LC₅₀ of 1.5 µg/L for juvenile amphipods [19]), we suggest the establishment of a protective mechanism expressed by a strong decrease of the ventilation activity of the animals. Remarkably, when bivalves were exposed to dissolved selenite, at [alg]= 1-2 × 10⁵ cells/mL, the ventilation increased by a factor of 2. To our knowledge, only a single study [10] has reported on the effect of selenite on ventilatory activity of a bivalve. The authors used the marine green mussel *Perna perna* and they tested selenite effect during a 1-hour exposure period instead of 3 days in the present work. They reported a ventilatory inhibition at selenite concentrations ranging from 0 to 300 µg/L, stimulation from 300 to 700 µg/L and again an inhibition at higher values. The present results show on the contrary, that selenite induced a strong ventilatory stimulation at 50 µg/L. However, any conclusion remains speculative as animal species and experimental conditions were different. For fish, Lemly [20] found that selenium (a mix of dietary selenium (5.16 µg/g) and waterborne selenate:selenite (4.83 µg/L) caused gill damages that decrease respiratory capacity while increasing oxygen consumption. Such a mechanism might explain here the strong stimulation of ventilatory activity following selenite exposure. Finally, selenate did not modify the ventilation of *C. fluminea*, which could indicate that this form was not detected. We must underline that the effect of Se on ventilation is qualitatively similar at high algal density but that statistical differences between groups exposed to SeMet or selenite and control group are only observed at the lower algal density, when ventilatory activity is enhanced.

3.1.2 Trophic route

Table 1. Concentration of total selenium in *Chlamydomonas reinhardtii* (pg/10⁵ cells) pre-exposed to dissolved selenium (3 forms tested at 2000 µg/L), at pH 7, 20 °C, for 1hr. Values are presented as mean ± standard error, n = 3.

	[Se]w µg/L	[Se]algae pg/10 ⁵ cells
selenomethionine	2000	169 ± 9
selenate	2000	26.6 ± 1.8
selenite	2000	20.6 ± 0.6

Table 1 summarizes the concentration of selenium in algae pre-exposed to selenium. We can observe that each form of selenium has been significantly accumulated in algae during the 1-hour exposure period but at different levels. Indeed, selenomethionine seems to be the most bioavailable form, followed by selenate and selenite.

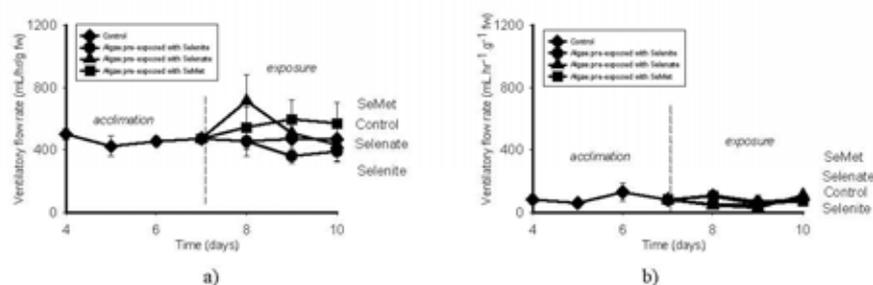


Figure 2. Changes in the ventilatory flow rate (mL/hr/g fw) of *C. fluminea*, as a function of time (days). A 7-day acclimation phase was followed by a 3-day exposure period to algal-bound selenium (3 selenium forms tested for pre-exposure of algae at 2000 µg/L), at two different algal densities: A: 1-2 × 10⁵ cells/mL and B: 3-4 × 10⁵ cells/mL. Asterisks indicate values significantly different from that characterizing the control (Anova, p ≤ 0.05).

Figure 2 reports the ventilatory flow rate of *C. fluminea* as a function of time, for the two algal densities tested. In reference conditions, the ventilatory flow rates characterizing the control groups are not statistically different from the ones measured in the previous experiment. This illustrates the reproductibility and the strength of the relationship between the ventilatory flow rate and algal concentration, for *C. fluminea* studied in our experimental conditions. It's clear that at the Se concentrations tested, the addition of algal-bound selenium does not induce any statistically significant change in terms of ventilation of *C. fluminea*.

3.2 Metalloid bioaccumulation

3.2.1 Direct route

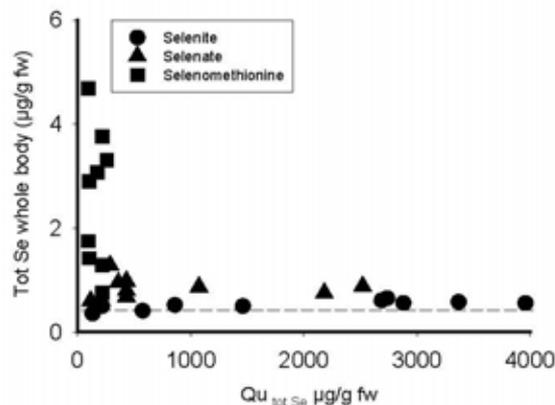


Figure 3. Total Se in the whole body of *Corbicula fluminea* ($\mu\text{g/g fw}$) as a function of total dissolved Se passing through the gills during a 3-day exposure period. Each point corresponds to one bivalve and dotted line to background level.

Total selenium accumulated in the whole body of *C. fluminea* is represented as a function of the quantity of dissolved Se that has been passing through the bivalve gills during the 3-day exposure period. The bioaccumulation rates of the various forms of Se are very different. For example, although a large amount of selenite passed through the gills, because of a strong hyperventilatory response, this form is not bioaccumulated to a high extent. At the opposite, albeit a small quantity of Se has passed through the bivalve (due to the large decrease of ventilation in presence of SeMet), SeMet has been largely accumulated, indicating a high bioavailability of this form. It demonstrated the absence of a relationship between total dissolved Se passing through the gills and bioaccumulation in *C. fluminea* irrespective of selenium speciation. It evidently underlines the importance of speciation. As regards selenite and selenate, other studies have shown that they can compete with sulphate for uptake, because of their structural similarities [21-22]. It is generally accepted that SO_4 is a relatively non-penetrating anion for bivalves [23]. This could explain the poor availability of the Se inorganic forms. On the other hand, in our experiments SeMet seems to be very bioavailable. This is consistent with the literature, which indicates that SeMet is incorporated by an active transport system shared with methionine.

3.2.2 Trophic route

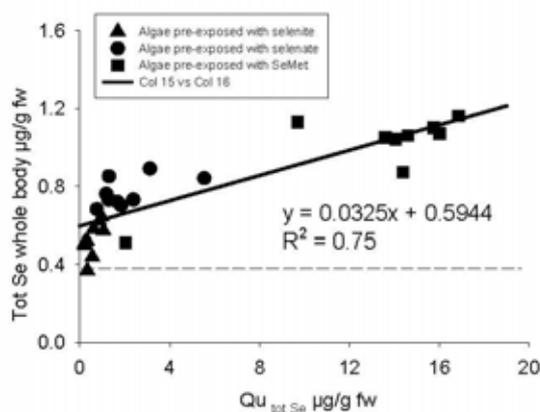


Figure 4. Total Se in whole body of *Corbicula fluminea* (µg/g fw) as a function of total algal-bound Se passing through the gills during a 3-day exposure period. Each point corresponds to one bivalve and dotted line to background level.

Total Se accumulated in whole body of *C. fluminea* is represented as a function of the quantity of algal-bound Se passing through the bivalve during the exposure period. It shows that bioaccumulation increases with the total algal-bound Se passing through the gills and potentially eaten by the animals. A linear regression can be applied with a $R^2 = 0.75$. In this case, ventilation becomes a limiting factor. Two hypotheses can be formulated: once taken up by the algae, each waterborne Se form is transformed and stored in the same chemical form, or, once Se is absorbed in the digestive tract of *C. fluminea*, all the Se forms are transformed in the same way and so, have got the same bioavailability. The results suggest a transformation of Se inorganic forms into much more bioavailable organic forms.

4. CONCLUSION

The present work demonstrates that the ventilation of *C. fluminea* is influenced by algal density and by selenium species. We show that the ventilatory response is closely dependent on the metal form, SeMet inhibits, selenite stimulates and selenate does not influence ventilation. There is no relationship between total dissolved Se passing through the gills and bioaccumulation in *C. fluminea*: which underline the primary importance of speciation. SeMet appears as the more bioavailable form under our experimental conditions. As regard to algal-bound selenium, we demonstrated the existence of a relationship between total algal-bound Se passing through gills and bioaccumulation rates. Thus, as a conclusion, bioaccumulation of Se in bivalves appears as the result of a complex balance between speciation, dissolved and/or algal-bound form and ventilatory activity.

Acknowledgments

This work is part of the ENVIRHOM program funded by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety.

References

- [1] Lemly A.D., 2004. *Ecotox. Environ. Safe*. In press.
- [2] Kiffney P., Knight A., *Arch. Environ. Toxicol.* **19** (1990) 488-494.
- [3] Wang C., Lovell R.T., *Aquaculture*. **152** (1997) 223-224.
- [4] Arteel G.E., Sies H., *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **10** (2001) 153-158.
- [5] Lemly A.D., *Ecotox. and Environ. Safe*. **10** (1985) 314-338.
- [6] Andres S., Baudrimont M., Lapaquellerie Y., Ribeyre F., Maillet N., Latouche C., Boudou A., *Environ. Toxicol. Chem.* **18** (1999) 2462-2471.
- [7] Gunther A.J., Davis J.A., Hardin D.D., Gold J., Bell D., Crick J.R., Scelfo G.M., Sericano J., Stephenson M., *Mar. Pollut. Bull.* **38** (1999) 170-181.
- [8] Foe C., Knight A., *Hydrobiologia*. **133** (1986) 155-164.
- [9] Tran D., Boudou A., Massabuau J.C., *Environ. Toxicol. Chem.* **21** (2002) 327-333.
- [10] Watling H.R., Watling R.J., *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* **29** (1982) 651-657.
- [11] Tran D., Massabuau J.C., Garnier-Laplace J., 2004. *Environ. Toxicol. Chem.* **23** (2004) 739-747.
- [12] Tinggi U., *Toxicol. Lett.* 2003 (137) 103-110.
- [13] Guo X., Wu L., *Ecotox. and Environ. Safe*. **39** (1998) 207-214.
- [14] Coughlan J., *Mar. Biol.* **2** (1969) 356-358.
- [15] Gleyzes C., Seby F., Lespes G., Potin-Gautier M., *Analysts*: **25** (1997) 273-278.
- [16] Tran D., Ciret P., Ciutat A., Durrieu G., Massabuau J.C., *Environ. Toxicol. Chem.* **22** (2003a) 914-920.
- [17] Tran D., Fournier E., Durrieu G., Massabuau J.C., *Aquat. Toxicol.* **65** (2003b) 317-327.
- [18] Fournier E., Tran D., Denison F., Massabuau J.C., Garnier-Laplace J., *Environ. Toxicol. Chem.* **23** (2004) 1108-1114.
- [19] Hyne R.V., Hogan A.C., Pablo F., Roach A.C., *Ecotox. Environ. Safe*. **52** (2002) 30-37.
- [20] Lemly A.D., *Aquat. Toxicol.* **27** (1993) 133-158.
- [21] Riedel G.F., Sanders J.G., *Environ. Toxicol. Chem.* (1996) 15: 1577-1583.
- [22] Morlon H., Fortin C., Adam C., Garnier-Laplace J. (2003). SETAC Europe 2003, Hambourg.
- [23] Dietz TH, Byrne RA., *Can. J. Zool.* (1999) 77: 331-336.

Tableau 10 : Concentration en Se total (Se_t), débit ventilatoire moyen (\dot{V}_w) et coefficient d'extraction (CE) du sélénium chez *C. fluminea* en fonction de la concentration en Se dans l'eau ([Se]), de la forme de Se étudiée et de la densité d'algues (X). A : Se apporté par la voie directe ; B : Se apporté par la voie trophique (moyenne \pm écart type, $n = 5$). Le bruit de fond initial en Se (Se_0) chez *C. fluminea* est de $0.45 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.f.

A : VOIE DIRECTE

Forme Se	[Se] ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	X (cells $\cdot\text{mL}^{-1}$)	Se_t ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.f.)		\dot{V}_w ($\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)		CE (%)	
			moyenne	écart type	moyenne	écart type	moyenne	écart type
sélénite	50	150 000	0.59	0.04	871	148	0.005	0.002
sélénite	50	350 000	0.46	0.07	181	150	-	-
sélénite	500	150 000	1.58	0.40	798	150	0.004	0.001
sélénite	500	350 000	1.78	0.55	110	61	0.041	0.028
séléniate	50	150 000	0.78	0.13	407	239	0.017	0.014
séléniate	50	350 000	0.94	0.22	105	19	0.084	0.047
séléniate	500	150 000	3.56	0.45	480	274	0.030	0.021
séléniate	500	350 000	2.52	0.99	115	34	0.062	0.038
SeMet	50	150 000	3.48	2.27	58	38	2.209	1.546
SeMet	50	350 000	2.40	0.96	48	19	1.263	0.729

B : VOIE TROPHIQUE

Forme Se	[Se] ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	X (cells $\cdot\text{mL}^{-1}$)	Se_t ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.f.)		\dot{V}_w ($\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)		CE (%)	
			moyenne	écart type	moyenne	écart type	moyenne	écart type
sélénite	200	150 000	0.39	0.04	427	110	-	-
sélénite	200	350 000	0.51	0.05	81	15	-	-
sélénite	2000	150 000	0.57	0.08	366	100	17.64	4.33
sélénite	2000	350 000	0.48	0.07	45	31	-	-
séléniate	200	150 000	0.53	0.04	433	125	-	-
séléniate	200	350 000	0.55	0.03	75	25	-	-
séléniate	2000	150 000	0.72	0.03	544	217	16.93	6.27
séléniate	2000	350 000	0.93	0.24	280	201	29.85	17.96
SeMet	200	150 000	0.78	0.10	681	242	3.93	0.87
SeMet	200	350 000	0.58	0.05	81	31	5.27	2.98
SeMet	2000	150 000	0.93	0.26	679	323	3.67	0.72
SeMet	2000	350 000	0.99	0.22	216	46	7.27	2.16

« - » valeurs ne pouvant pas être calculées

4.1.3.3. Principales avancées et conclusions

Principales avancées

Dans cet article, les résultats d'accumulation par les voies directe et trophique ont été repris de façon standardisée et représentés en fonction de la quantité totale de Se passant par les branchies. Cette représentation permet de souligner visuellement, l'importance des facteurs environnementaux et/ou physiologiques pour chaque voie de contamination et l'importance de la voie trophique dans les processus de bioaccumulation. Ces conclusions ont été affinées par des études statistiques. L'effet des facteurs environnementaux sur le coefficient d'extraction ont donc été analysés.

Analyses statistiques des coefficients d'extraction :

Nous avons appelé coefficient d'extraction (CE), la quantité de Se extraite par *C. fluminea* à partir des quantités d'eau ventilées en 3 jours. Les calculs ont été faits en supposant que les bivalves restaient toujours ouverts. Ainsi ,

$$CE = \frac{(Se_t - Se_0)}{Q_u} \bullet 100$$

où, Se_t est la concentration en Se total ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.f.) dans le bivalve après 3 jours d'exposition, Se_0 la concentration en Se total dans le bivalve à t_0 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.f.) qui correspond au bruit de fond initial en Se avant contamination, Q_u la quantité totale de Se ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.f.) passant par les branchies de *C. fluminea* pendant les 3 jours d'exposition.

Les valeurs moyennes des coefficients d'extraction du sélénium chez *C. fluminea*, issues des expérimentations précédentes sont résumées dans Tableau 10. Nos données ne permettent pas les tests statistiques paramétriques. Les données ont donc été analysées statistiquement par le test non paramétrique de Kruskal Wallis. Il ne permet d'étudier qu'un seul facteur à la fois. Pour chaque voie de contamination, nous avons étudié l'impact du facteur forme de sélénium, dose de sélénium et densité algale. Lorsqu'un effet significatif du traitement est indiqué, des comparaisons post-hoc à l'aide du test de Dunn's ont été réalisées.

Il faut souligner que malgré l'excellente sensibilité de la technique utilisée pour la mesure du sélénium, la faible accumulation de Se dans certains groupes d'organismes n'a pas permis d'obtenir des concentrations significatives en Se pour toutes les conditions. Les analyses statistiques n'ont donc porté que sur les conditions présentant suffisamment de données pour tous les groupes.

Effet forme de sélénium :

Pour chaque voie de contamination, il n'y a qu'une condition pour laquelle les données de coefficient d'extraction soient disponibles pour toutes les formes de sélénium ($50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ à $1-2 \times 10^5 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour la voie directe et $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ à $1-2 \times 10^5 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour la voie trophique). Les analyses statistiques ont donc porté sur ces groupes et indiquent que la SeMet est mieux extraite que le sélénite ($p < 0.05$) par la voie directe. Par contre, par la voie trophique, sélénite et séléniate sont mieux extraits que la SeMet ($p < 0.05$).

Effet de la dose de Se :

L'effet dose ne peut pas être étudié pour toutes les formes de Se, ni par la voie directe, ni par la voie trophique. Des analyses statistiques ont pu être réalisées concernant l'effet dose du sélénite et du séléniate par la voie directe et l'effet dose de la SeMet par la voie trophique. Aucune différence significative d'efficacité d'extraction n'a été observée en fonction de la dose de sélénium apportée, que ce soit sous forme de sélénite ou de séléniate, par la voie directe ou sous forme de SeMet par la voie trophique.

Effet de la densité d'algues :

L'effet de la densité d'algues sur le coefficient d'extraction a pu être étudié pour les 3 formes de Se par la voie directe et uniquement pour le séléniate et la SeMet par la voie trophique.

Par la voie directe, dans les cas du sélénite apporté à $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, l'extraction du sélénite est significativement meilleure à $3-4 \times 10^5 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$. Dans le cas du séléniate, elle est meilleure à $3-4 \times 10^5 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ à la concentration $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et n'est pas différente à $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. En ce qui concerne la SeMet nous n'avons pas observé de différence d'efficacité d'extraction entre faible et forte densité d'algues.

Par la voie trophique, il n'y a pas de différence d'efficacité d'extraction pour le séléniate, mais il y a une meilleure extraction de la SeMet à $3-4 \times 10^5$ cells·mL⁻¹ pour la concentration 200 µg·L⁻¹ et il n'y a pas de différence pour 2000 µg·L⁻¹.

L'impact de la densité d'algues sur le coefficient d'extraction existe mais est relativement faible et non systématique aux concentrations d'algues et de contaminants testées.

Effet de la voie de contamination :

Nous ne disposons pas de tests permettant de comparer directement les efficacités d'extraction par la voie directe et par la voie trophique. Cependant, dans nos conditions, les coefficients d'extraction des formes inorganiques sont plus élevés par la voie trophique que par la voie directe. Par contre, l'efficacité d'extraction de la SeMet ne semble pas différer entre les deux voies de transfert. Plusieurs hypothèses s'offrent à nous :

- Le sélénite et le séléniate sont biotransformés dans les algues en formes organiques beaucoup plus biodisponibles ;
- la SeMet reste sous forme de SeMet une fois internalisée dans l'algue ;
- les formes de sélénium biodisponibles pour les bivalves changent selon la barrière membranaire à franchir (branchie ou tube digestif).

En milieu naturel, la bioaccumulation se fait simultanément par les 2 voies de contamination. Afin de pouvoir comparer visuellement la voie directe et la voie trophique, une simulation de la bioaccumulation du sélénium après 3 jours, par ces différentes voies a été effectuée en apportant le sélénium sous différentes formes. Pour cela plusieurs hypothèses ont été émises : il n'y a pas d'effet dose sur le coefficient d'extraction et les voies de contaminations sont additives. La simulation a été faite pour une densité algale de $1-2 \times 10^5$ cells·mL⁻¹ à 50 µg·L⁻¹ de Se total dans la colonne d'eau. L'étude de la distribution du sélénium dans 11 eaux de surface différentes, indique qu'en moyenne, 16 % du sélénium total est fixé sur la phase particulaire (EPA, 2004). Pour notre simulation, un facteur de sécurité de plus d'un ordre de grandeur a été appliqué, ainsi les calculs ont été faits en supposant que 0.5 % du sélénium étaient fixés sur les algues. Les valeurs de débits ventilatoires considérés pour ces calculs sont ceux imposés par le sélénium dissous (représentant 99.5 % pour notre simulation, soit 49.75 µg·L⁻¹) sur la base des résultats obtenus précédemment à 50 µg·L⁻¹. Les résultats sont présentés dans la Figure 24.

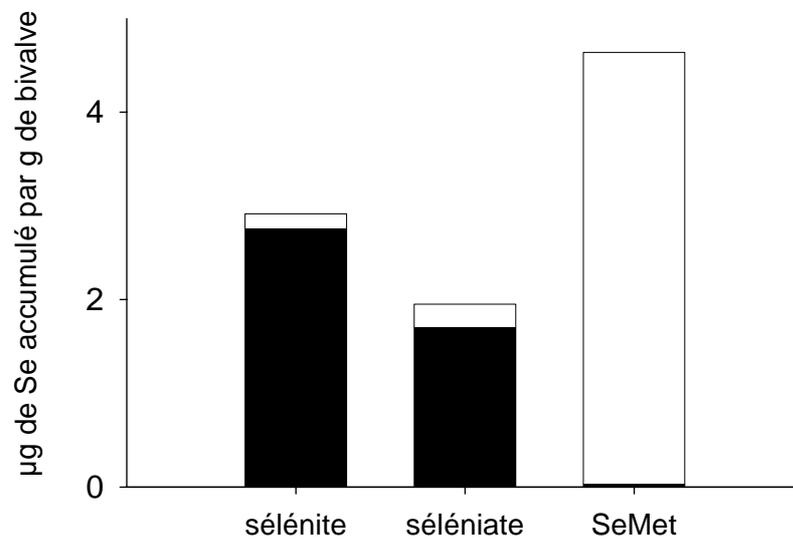


Figure 24 : Simulation des quantités de Se bioaccumulées par C. fluminea par les voies directe et trophique, après contamination pendant 3 jours à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Se dont 0.5 % serait fixé sur la phase particulaire. La simulation a été faite pour une contamination à 100 % de sélénite, séléniate, ou SeMet. Noir : voie trophique ; Blanc : voie directe.

Ces résultats montrent que les formes inorganiques sont beaucoup plus biodisponibles par la voie trophique que par la voie directe, tandis que la SeMet est beaucoup plus disponible par la voie directe que par la voie trophique. La chute de débit ventilatoire imposée par la SeMet dissous, fait que peu d'algues seront prises en charge par le bivalve et donc que peu de Se pourra en être extrait, alors que la stimulation du débit ventilatoire imposée par le sélénite fera que beaucoup d'algues seront prises en charge par le bivalve et donc que beaucoup plus de Se pourra être extrait.

4.1.4.Principales avancées et conclusions du chapitre

- Avancées en termes de processus impliqués dans la bioaccumulation du sélénium chez *C. fluminea* :

Dans ce chapitre nous avons appréhendé des effets de facteurs physiologiques et environnementaux sur les processus de bioaccumulation du sélénium chez *C. fluminea*. Aux concentrations testées, les résultats indiquent que le facteur limitant par la voie directe est la spéciation, la forme organique, SeMet, étant par cette voie, beaucoup mieux extraite que les formes inorganiques. La ventilation du bivalve quant à elle, ne semble pas modifier les processus de bioaccumulation du sélénium par la voie directe. Par la voie trophique, la ventilation ainsi que la spéciation semblent toutes deux avoir un intérêt dans l'explication de la bioaccumulation du sélénium. Après métabolisation dans les algues, les formes inorganiques de Se semblent beaucoup mieux extraites par le bivalve. L'accumulation des formes inorganiques (majoritaires en eau douce) se fera principalement par la voie trophique. En revanche, la SeMet (minoritaire en eau douce), sera principalement bioaccumulée par la voie directe.

- Avancées en termes d'impact du sélénium sur la physiologie du bivalve :

Nous avons montré que le sélénium apporté par la voie directe sous forme de sélénite et SeMet pouvait modifier le comportement ventilatoire de *C. fluminea*. Ceci peut être signe d'une toxicité de ces formes de Se pour *C. fluminea*. Ceci affecte la mécanique ventilatoire, qui assure 2 fonctions vitales chez le bivalve : la respiration et la nutrition. Nous étudierons dans le troisième chapitre si ces effets sont associés à des effets toxiques du sélénium au niveau subcellulaire.

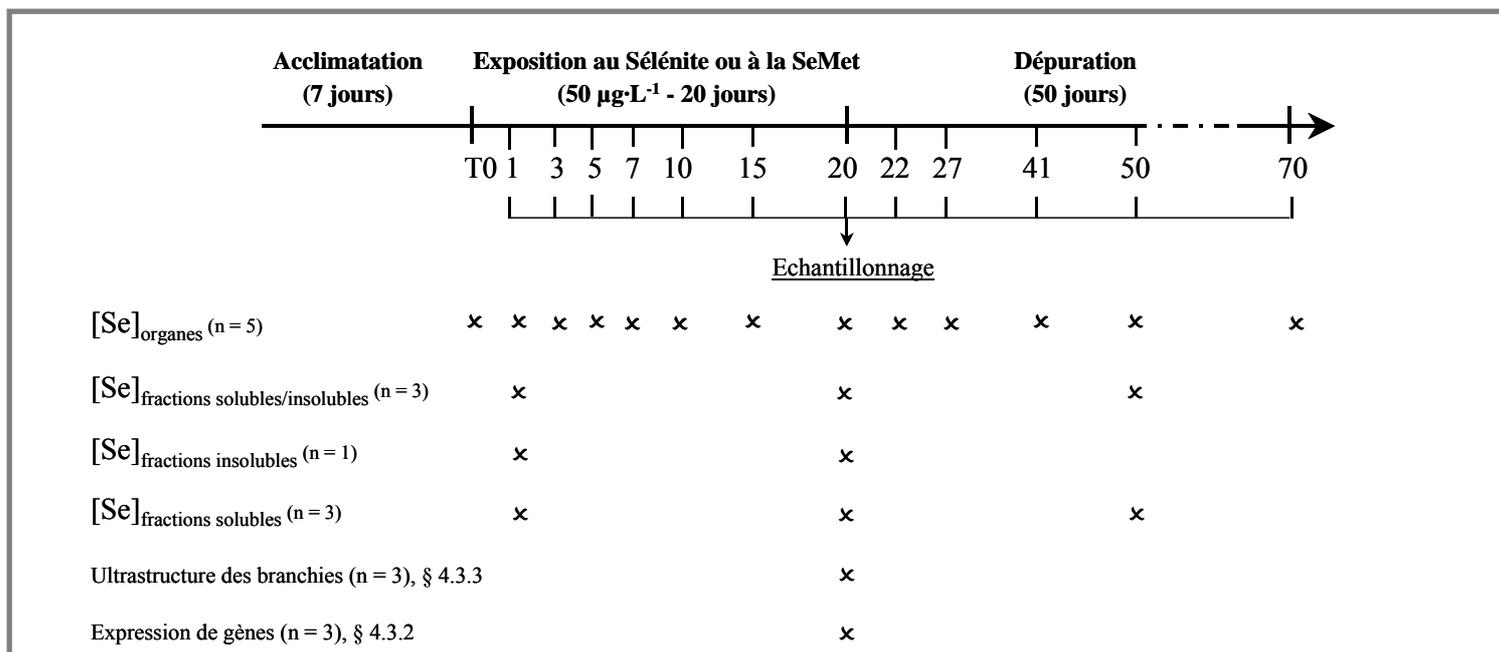
En conclusion, la prise en compte des facteurs physiologiques et environnementaux semble primordiale pour comprendre la bioaccumulation du sélénium dans les écosystèmes naturels, où les deux voies de contamination sont présentes simultanément.

4.2. Bioaccumulation du sélénium à différents niveaux d'organisation biologique chez *C. fluminea*

4.2.1. Introduction

Les processus impliqués dans la bioaccumulation de polluants peuvent être appréhendés à différents niveaux d'organisation biologique. La première approche, classique, consiste à caractériser les cinétiques de bioaccumulation et de dépuration au niveau de l'organisme entier, et des différents organes. Elle permet de déterminer la période biologique du polluant dans l'organisme. Ensuite, pour mieux appréhender les notions de biodisponibilité, toxicité et transfert trophique, une méthodologie basée sur la compartimentation des métaux au niveau tissulaire peut être utilisée (Wallace *et al.*, 2003; Wallace et Luoma, 2003). En remplaçant *C. fluminea* au sein d'une chaîne trophique, en tant que proie pour un maillon trophique supérieur, l'étude de la distribution tissulaire et cellulaire du sélénium peut être très informative pour évaluer le risque associé à son incorporation par des prédateurs. Cette approche consiste à distinguer les quantités de métaux associées au cytosol et à la fraction insoluble des tissus, incluant organites, débris cellulaires et composés minéraux responsables de la liaison de certains métaux (Bonneris *et al.*, 2005). D'une part, pour de nombreux organismes, les métaux/métalloïdes de la fraction soluble de la proie ingérée sont généralement plus biodisponibles que ceux de la fraction insoluble (Reinfelder *et al.*, 1997). D'autre part, la présence de métaux au niveau des organites tels que les mitochondries par exemple, peut être signe de toxicité tandis que leur présence dans les granules peut être signe de détoxification (Wallace *et al.*, 2003). Au sein du cytosol, il convient ensuite d'isoler les protéines. L'intérêt de nombreux chercheurs s'est focalisé sur les métallothionéines (Giguere *et al.*, 2003; Dragun *et al.*, 2004; Bonneris *et al.*, 2005) en raison de leur rôle biologique, important notamment pour la complexation des métaux toxiques, tels que le Cd. En ce qui concerne le sélénium, il peut être incorporé dans de très nombreuses protéines (Arteel et Sies, 2001; Tapiero *et al.*, 2003; Ducros et Favier, 2004), spécifiquement ou aspécifiquement selon les formes, il conviendrait donc, d'étudier sa distribution sur une large gamme de protéines afin de mieux appréhender sa toxicité.

A : Déroulement de l'expérience, nature et fréquence des analyses :



B : Conditions expérimentales

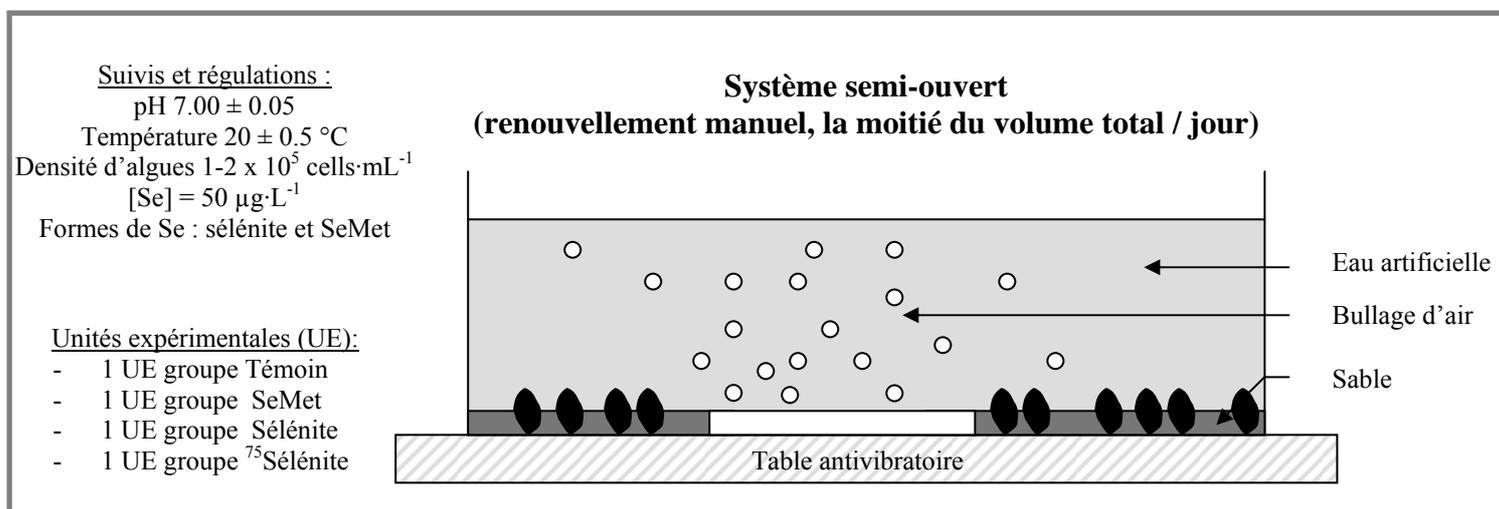


Figure 25 : Déroulement (A) et conditions (B) de l'expérience sur la bioaccumulation du sélénium à différents niveaux d'organisation biologique.

Sur la base des résultats obtenus dans le chapitre précédent, nous avons retenu les conditions les plus marquées pour analyser les processus de bioaccumulation selon cette méthodologie d'étude de la bioaccumulation à différents niveaux d'organisation biologique. La voie directe a été retenue afin de pouvoir maîtriser la forme chimique de Se au niveau de la source de contamination. Les 2 formes, sélénite et SeMet, ont été sélectionnées, car ce sont deux formes différentes, une organique et une inorganique, ayant chez l'animal une métabolisation différente (Ducros et Favier, 2004), et ayant induit dans nos conditions expérimentales, des comportements marqués en termes de ventilation chez *C. fluminea* et des bioaccumulations très contrastées (§ 4.1.1).

Les prélèvements effectués et les conditions expérimentales sont résumés dans la Figure 25. Trois principales unités expérimentales ont été mises en place (témoin, SeMet, sélénite), ainsi qu'une troisième contenant du sélénite marqué au ^{75}Se , pour l'analyse du fractionnement subcellulaire (pour une meilleure limite de détection par scintillation liquide β). Une partie des organismes échantillonnés dans cette expérience ont servi pour l'étude de toxicité (§ 4.3.2 ; § 4.3.3).

a) Cinétiques d'accumulation et de dépuraction dans les organes et le corps mou entier de *C. fluminea*.

La première étape concernant la caractérisation de l'accumulation du sélénium est d'analyser sa répartition tissulaire (branchies, masse viscérale, pied et muscles adducteurs). Ainsi, les cinétiques d'accumulation dans les organes des bivalves exposés à de la SeMet ou à du sélénite à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pendant 20 jours ont été étudiées. La cinétique de dépuraction a également été suivie pendant 50 jours. Les données d'accumulation et de dépuraction du sélénium dans le corps mou entier ont été modélisées selon la théorie des modèles compartimentaux (§ 3.8), ce qui a permis d'obtenir des estimations de la période biologique (T_b) et du facteur de bioconcentration à l'équilibre (BCF) pour chaque forme de Se étudiée.

b) Part de Se dans la fraction soluble et la fraction insoluble

La part de Se dans la fraction cytosolique et dans la fraction insoluble des organes du bivalve a été analysée après 1 période courte (1 jour, t_1) et une période longue d'accumulation (20 jours, t_{20}), ainsi qu'après 30 jours de dépuraction (t_{50}).

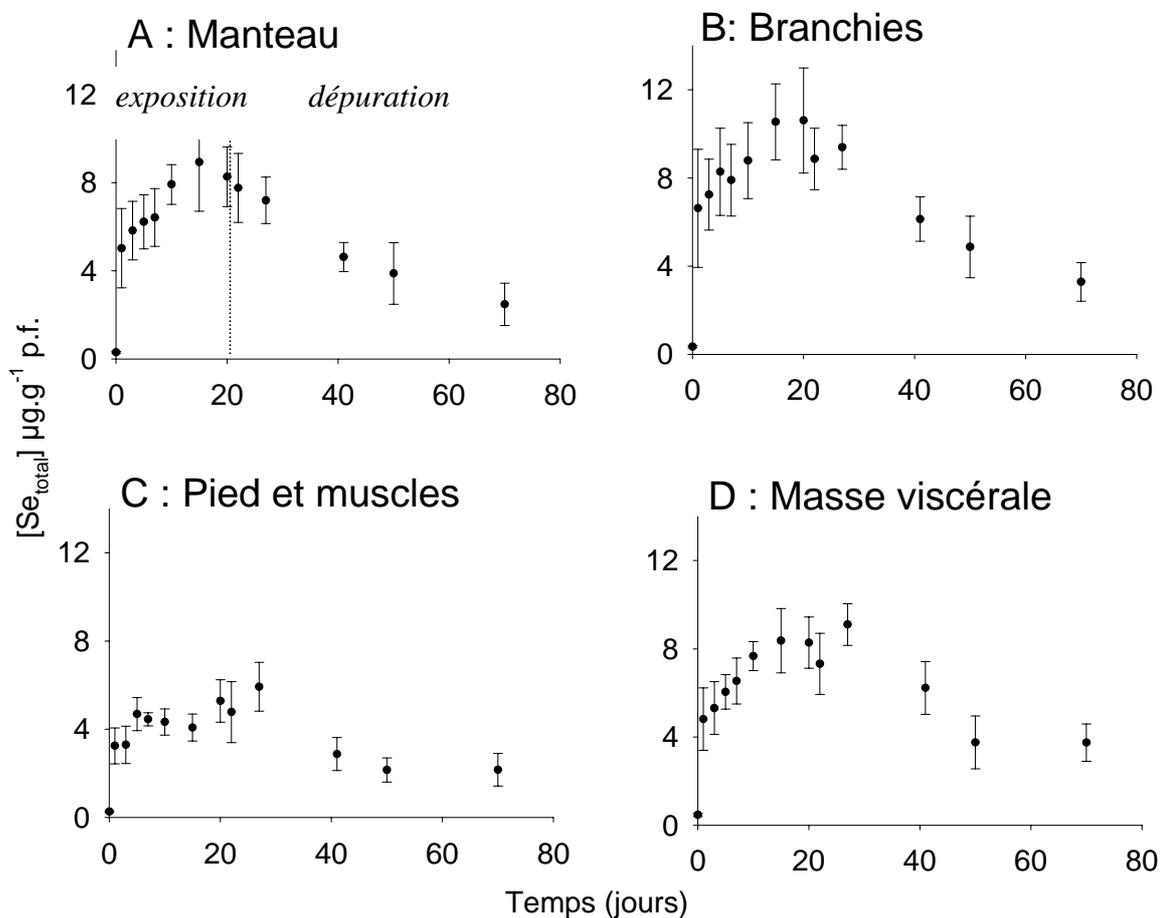


Figure 26 : Cinétique d'accumulation et de dépuraton du sélénium dans les organes de *C. fluminea* exposés par la voie directe pendant 20 jours à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de SeMet (moyenne \pm écart type, $n = 5$).

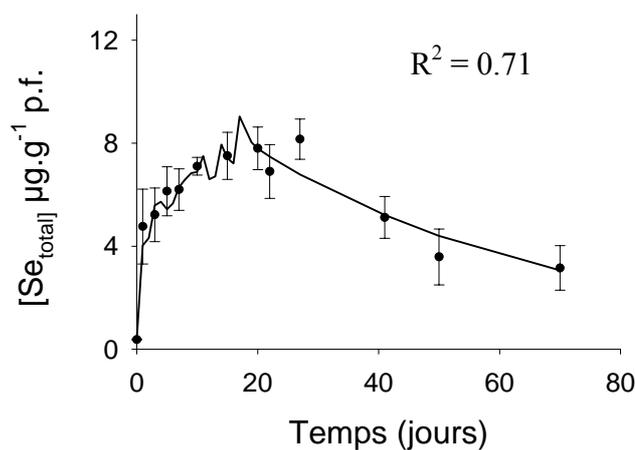


Figure 27 : Cinétique d'accumulation et de dépuraton du sélénium dans le corps mou entier de *C. fluminea* exposés par la voie directe pendant 20 jours à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de SeMet compartimentaux (moyenne \pm écart type, $n = 5$). Les données ont été modélisées selon la théorie des modèles compartimentaux.

Sur la base des résultats obtenus précédemment, ces analyses ont été effectuées dans les branchies et masse viscérale, organes cibles en termes de bioaccumulation du sélénite et de la SeMet par la voie directe.

c) Répartition du sélénium au sein de la fraction insoluble

La répartition du sélénium au niveau de la fraction insoluble a pu être caractérisée pendant la phase d'accumulation par centrifugation différentielle. Elle permet de séparer les noyaux, granules et débris cellulaires (C1), les mitochondries et lysosomes (C2), membranes (C3) et les microsomes (C4) (Paquet, 1993).

d) Répartition du sélénium sur les protéines cytosoliques

Dans le cadre de la compréhension de la biodisponibilité et des effets du sélénium dans les écosystèmes aquatiques, l'étude des biotransformations du sélénium à la base des réseaux trophiques (producteurs et consommateurs primaires) est primordiale. Ces nouvelles formes conditionnent en effet le transfert et la toxicité de l'élément vers les maillons trophiques supérieurs. Il apparaît donc intéressant de caractériser les principales formes chimiques impliquées dans les processus de toxicité, détoxication ou de défense cellulaire chez *C. fluminea*. Une première étape, que nous présentons ici, est la caractérisation de la répartition cytosolique du sélénium au niveau des grands groupes protéiques. A l'aide d'une chromatographie basse pression, munie d'une colonne à exclusion stérique, nous avons récupéré différentes fractions protéiques sur lesquelles nous avons mesuré les quantités de Se associé par HG-QFAAS (dans le cas de la SeMet) et/ou scintillation liquide β (dans le cas du $^{75}\text{Sélénite}$).

4.2.2. Résultats

a) Cinétiques d'accumulation et de dépuration dans l'organisme entier et les organes de *C. fluminea*

La Figure 26 présente l'évolution de la concentration en Se total (en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.f.) au cours du temps dans les principaux organes de *C. fluminea* exposés à une concentration dans l'eau de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de SeMet pendant 20 jours. Pendant la phase de contamination une augmentation très rapide de la concentration en Se dans les différents organes est observée.

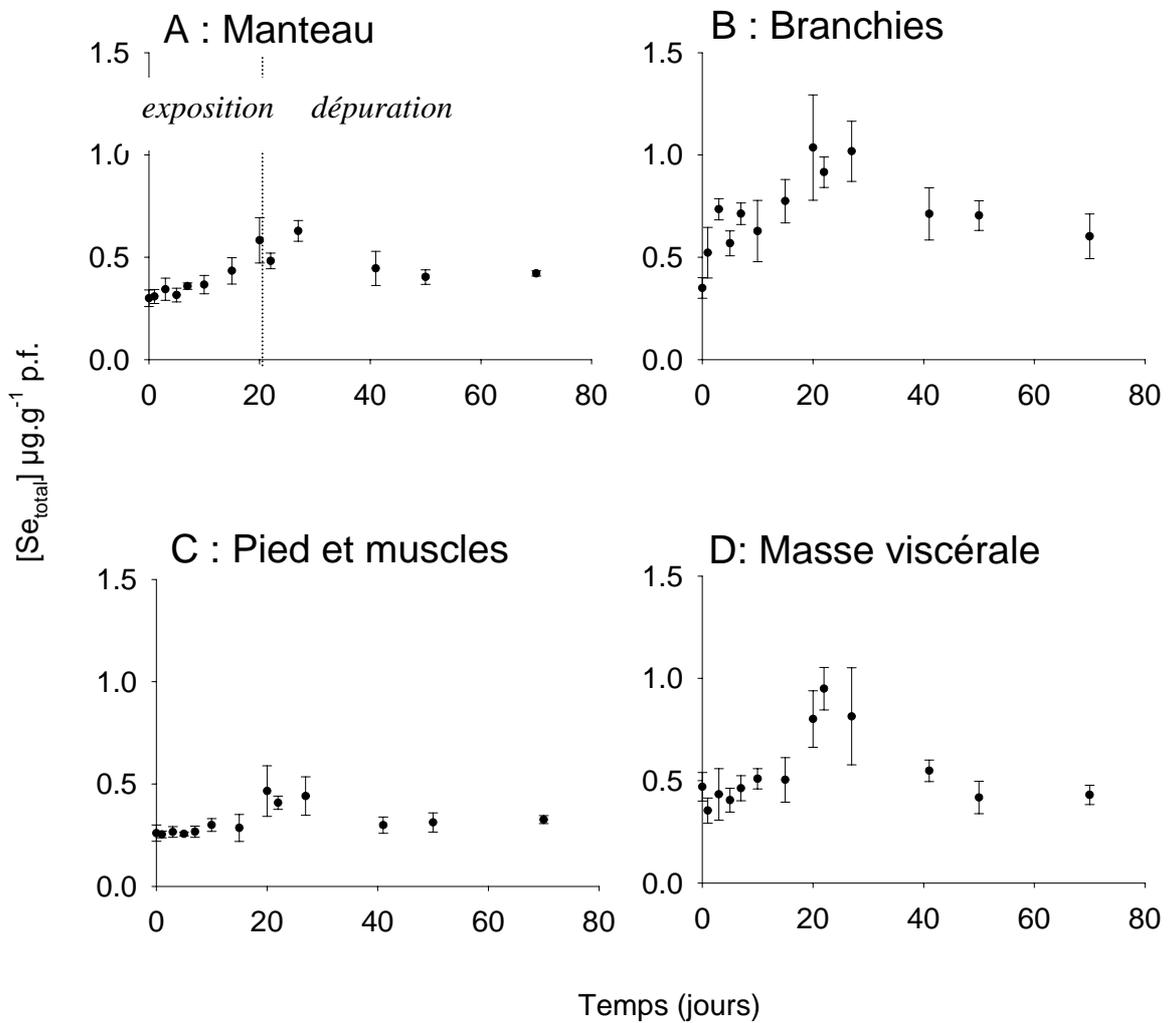


Figure 28 : Cinétique d'accumulation et de dépuraction du sélénium dans les organes de *C. fluminea* exposés par la voie directe pendant 20 jours à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sélénite (moyenne \pm écart type, $n = 5$)

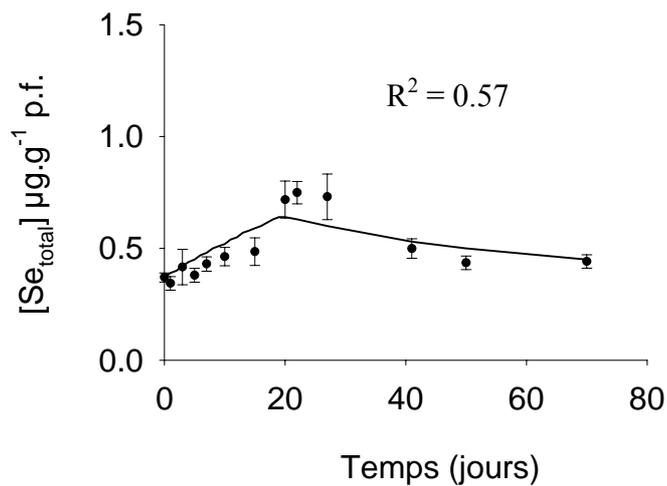


Figure 29 : Cinétique d'accumulation et de dépuraction du sélénium dans le corps mou entier de *C. fluminea* exposés par la voie directe pendant 20 jours à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sélénite (moyenne \pm écart type, $n = 5$). Les données ont été modélisées selon la théorie des modèles compartimentaux.

En effet, après 1 jour de contamination, la concentration est multipliée par 15 dans les branchies, et par 12 dans la masse viscérale, par rapport à la concentration initiale à t_0 (bruit de fond). Puis la vitesse de charge diminue, on observe un début de saturation. Après 20 jours de contamination, la concentration de Se a été multipliée par 24 dans les branchies, et par 20 dans la masse viscérale, par rapport à la concentration initiale à t_0 . En ce qui concerne la dépuración, on observe également 2 vitesses de décharge du sélénium. Après 20 jours de dépuración (t_{40}), la moitié du sélénium a été relarguée pour l'ensemble des organes. Puis la cinétique de décharge diminue. Après 50 jours de dépuración, il reste encore 3 à 4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.f. de Se dans chaque organe (soit 40 à 50 % du sélénium initialement accumulé).

La Figure 27 présente les cinétiques de bioaccumulation et de dépuración de la SeMet dans le corps mou entier de *C. fluminea*. La cinétique de charge est très rapide le premier jour, puis elle diminue. Sur les 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.f. accumulés en 20 jours dans le corps mou entier de *C. fluminea*, 60 % ont été accumulés le premier jour. La cinétique de décharge quant à elle, est relativement rapide les 20 premiers jours, où environ 50 % du sélénium est dépuré. Puis, elle devient très lente. Après 50 jours, il reste encore environ 40 % du sélénium accumulé. Le modèle appliqué est un modèle à deux compartiments, où la T_b estimée est de 34 jours et le BCF de 480.

La Figure 28 présente l'évolution de la concentration en Se total (en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ p.f.) au cours du temps dans les principaux organes de *C. fluminea* exposés par voie directe à 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sélénite pendant 20 jours. On observe une cinétique de charge beaucoup plus lente que pour la SeMet. Après 20 jours de contamination, la concentration de Se n'a été multipliée que par 2 dans tous les organes. La décharge est rapide. Au temps 70 jours, correspondant à 50 jours de dépuración, la concentration de Se dans le bivalve est revenue pratiquement à sa valeur initiale à t_0 .

La Figure 29 présente les cinétiques de bioaccumulation et de dépuración du sélénite dans le corps mou entier de *C. fluminea*. La cinétique de charge est beaucoup plus lente que pour la SeMet et la décharge est également rapide, après 50 jours de dépuración l'organisme a pratiquement totalement éliminé le sélénium accumulé. Le modèle appliqué est à modèle à un compartiment, où la T_b estimée est de 27 jours et le BCF de 14.

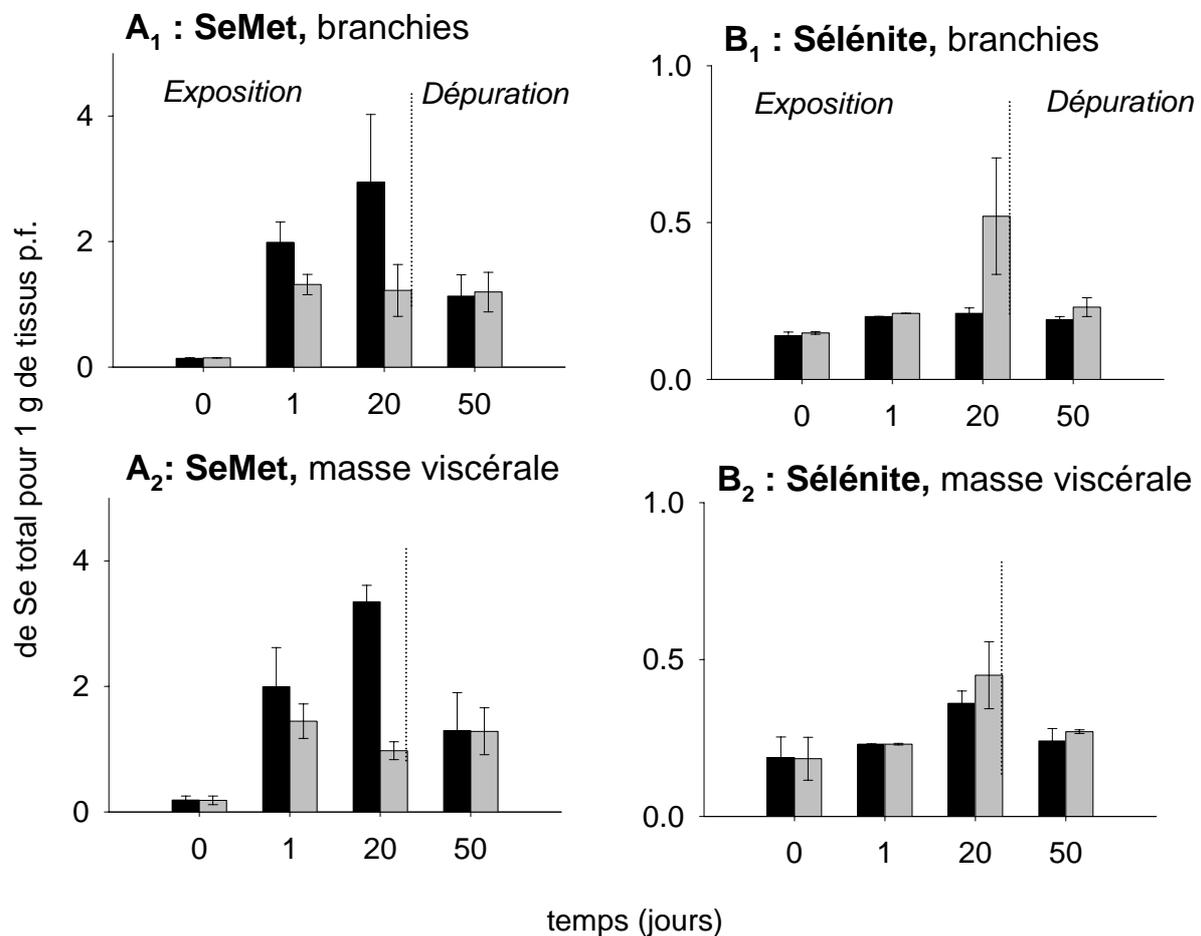


Figure 30 : Quantité de Se dans la fraction soluble et la fraction insoluble pour 1 g de tissu de *C. fluminea* aux temps 0, 1, 20 et 50 jours, correspondant à t_0 , 1 jour et 20 jours d'exposition à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et à 30 jours de dépuration respectivement. A : bivalves exposés à la SeMet ; B : bivalves exposés au sélénite. En noir, la fraction insoluble ; en gris, le cytosol (moyenne \pm écart type, $n = 3$)

b) Part de sélénium dans les fractions soluble et insoluble

Dans la Figure 30, la quantité de Se (en μg) présente dans chaque fraction, soluble et insoluble, pour 1g de tissu branchial ou viscéral, aux temps 0, 1, 20 et 50 jours, correspondant au t_0 de l'expérimentation (répartition chez les organismes témoins), à 1 et 20 jours de contamination et 30 jours de dépuración, a été présenté. Dans la Figure 30A, nous présentons les résultats concernant les bivalves exposés à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de SeMet. A t_0 , la répartition du sélénium entre la fraction soluble et la fraction insoluble est homogène dans les branchies et la masse viscérale. Après un temps court d'exposition (1 jour), on peut observer, au niveau des branchies (Figure 30A₁), que la quantité de Se dans le cytosol a beaucoup augmenté, mais aussi dans la fraction insoluble. Il y a environ $1.2 \mu\text{g}$ de Se dans le cytosol et un peu plus dans la fraction insoluble. Après un temps plus long d'exposition (20 jours), la quantité de Se (en μg) présente dans la fraction cytosolique n'a pas été modifiée, en revanche, la quantité de Se dans la fraction insoluble continue d'augmenter. A t_{50} qui correspond à 30 jours de dépuración, la quantité de Se dans le cytosol est toujours d'environ $1.2 \mu\text{g}$ pour 1 g de tissu tandis que la quantité de Se dans la fraction insoluble a largement diminué. Après 30 jours de dépuración il reste encore environ $1.2 \mu\text{g}$ de Se dans le cytosol et $1.2 \mu\text{g}$ de Se dans la fraction insoluble. En ce qui concerne la masse viscérale (Figure 30A₂), le profil est le même que celui de la branchie. Après 1 jour de contamination, une augmentation du sélénium dans les deux fractions est observée, avec environ $1.2 \mu\text{g}$ de Se dans le cytosol. A t_{20} , le sélénium augmente uniquement dans la fraction insoluble. Après 30 jours de dépuración, la part de Se dans la fraction insoluble a diminué et la part dans la fraction soluble est toujours identique ($1.2 \mu\text{g}$).

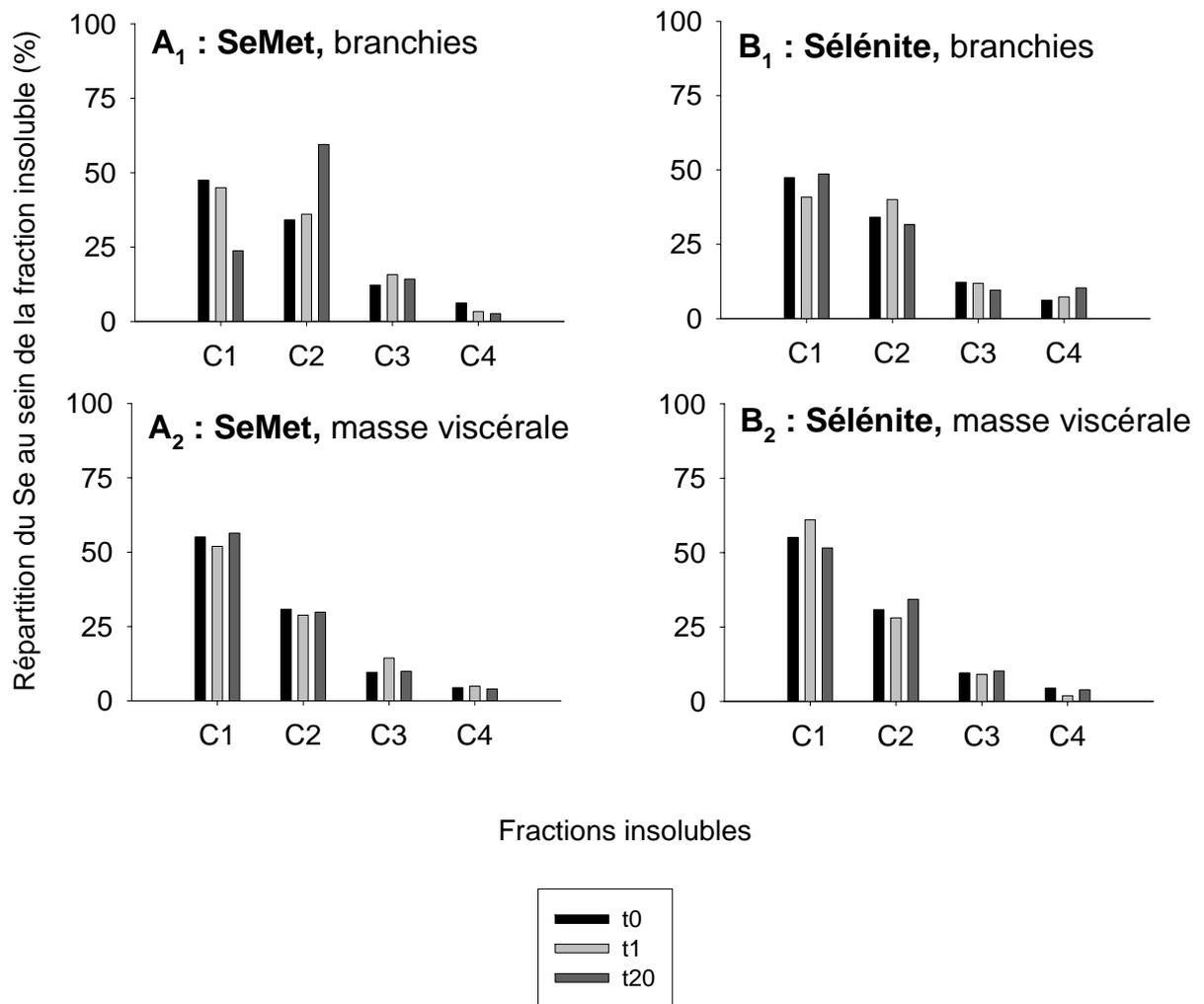


Figure 31 : Répartition du sélénium au sein de la fraction insoluble aux temps 1 et 20 jours. Les différents culots sont obtenus par centrifugation différentielle.

C1 : granules, débris cellulaires et noyaux ; C2 : lysosomes et mitochondries ; C3 : membranes ; C4 : microsomes. A : bivalves exposés à la SeMet ; B : bivalves exposés au sélénite (n = 1).

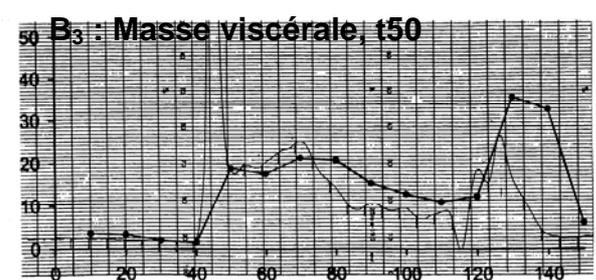
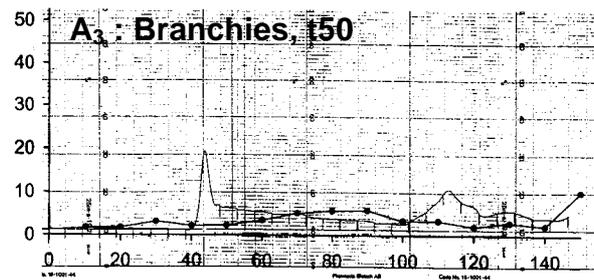
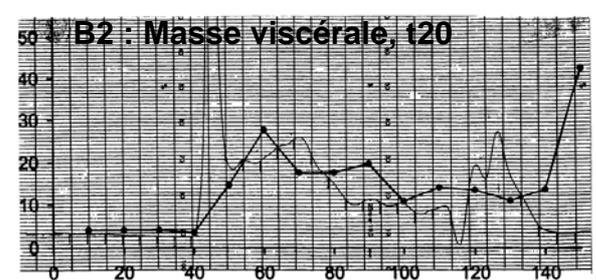
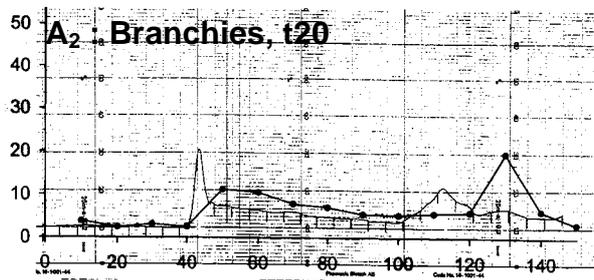
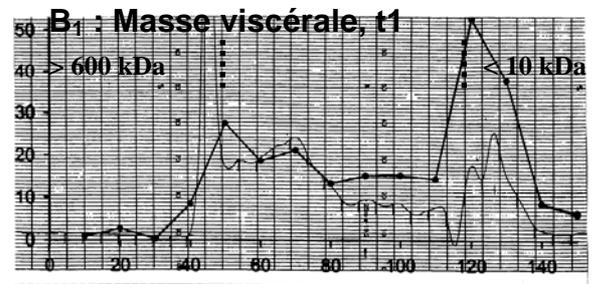
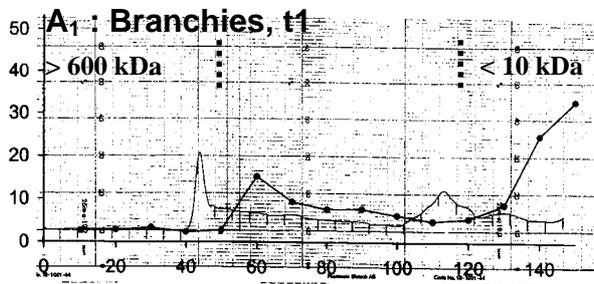
Les résultats concernant le sélénite sont présentés dans la Figure 31B. L'accumulation du sélénite dans les branchies et la masse viscérale est négligeable après 1 jour de contamination. Après 20 jours, la quantité de Se total augmente essentiellement dans le cytosol des branchies et de la masse viscérale. Le sélénium a également légèrement augmenté dans la fraction insoluble de la masse viscérale. La quantité de Se atteinte dans le cytosol après 20 jours d'exposition est seulement d'environ 0.5 µg pour 1 g d'organe p.f. Après 30 jours de dépuración (t50), la quantité de Se dans les deux fractions est pratiquement revenue au niveau de référence avant contamination.

c) Répartition du sélénium au niveau de la fraction insoluble

La répartition du sélénium au sein de la fraction insoluble (évaluée aux temps t1 et t20) est présentée sur la Figure 31. D'une manière générale, chez les organismes témoins aussi bien que contaminés, le sélénium se trouve essentiellement au niveau des débris cellulaires, organites et granules (C1 et C2, ~ 70 % du sélénium de la fraction insoluble) pour les deux organes considérés (branchies et masse viscérale). Cependant, en ce qui concerne la SeMet (Figure 31A₁) on observe dans les branchies après 20 jours de contamination une diminution de la part de Se dans la fraction incluant les débris cellulaires, noyaux et granules (C1) et une augmentation de sa part dans la fraction incluant les mitochondries et lysosomes (C2). Dans la masse viscérale, on observe aucun changement de répartition. Dans le cas du sélénite, la répartition n'est pas modifiée ni à t1 ni à t20, ni dans les branchies, ni dans la masse viscérale.

d) Répartition du sélénium sur les protéines cytosoliques

Les fractions cytosoliques obtenues à partir des branchies et masses viscérales des organismes contaminés en Se, ont été injectées dans la colonne d'exclusion stérique. Les protéines étaient détectées en ligne par spectrométrie UV (lecture de l'absorbance à 280 nm), tandis que le sélénium était dosé sur les fractions d'élution recueillies en sortie de colonne (par HG-QFAAS ou scintillation liquide β dans le cas du sélénite marqué ⁷⁵Se). Un recoupement des résultats d'analyse du sélénium dans le cytosol total et dans l'ensemble des fractions récupérées après élution, a permis de montrer qu'il n'y a eu aucune perte de Se au moment du passage sur colonne.



Volume d'élution (mL)

Figure 32 : Répartition du sélénium sur les protéines de la fraction cytosolique après exposition à la SeMet. L'axe des abscisses représente le volume d'élution, et l'axe des ordonnées l'intensité du signal associé aux protéines (absorbance) ou au Se (μg). Chromatogrammes (courbe) et dosages du sélénium (points expérimentaux avec courbe) ont été superposés. A : Branchies ; B : Masse viscérale ; t1 : 1 jour d'exposition, t20 : 20 jours d'exposition et t50 : 30 jours de dépuraton.

Les chromatogrammes d'absorbance UV obtenus par la chromatographie basse pression et les dosages de Se dans les différentes fractions collectées ont été superposés dans les Figure 32 et Figure 33. En ce qui concerne les bivalves exposés à la SeMet (Figure 32), on observe qu'au niveau des branchies (Figure 32A), le sélénium peut être retrouvé sur l'ensemble des protéines (600 à 10 kDa). On observe un bruit de fond général en Se dans toutes les fractions à t1 et t20 avec un pic important de Se en sortie de colonne, indiquant la présence de Se sur des protéines < 10 kDa). Après 30 jours de dépuración, le bruit de fond a largement diminué. On observe toujours un pic en sortie de colonne. En ce qui concerne la masse viscérale (Figure 32B), la quantité de Se est très importante dans toutes les fractions dès 1 jour. On note cependant un important pic en fin de colonne qui correspond à des composés de poids moléculaire < 10 kDa. Le profil reste identique à t1, t20 et t50.

En ce qui concerne les bivalves exposés au sélénite (Figure 33), on observe l'apparition d'un petit pic de sélénium en fin de colonne, ce qui correspond à des protéines < 10 kDa dès 1 jour de contamination. Après 20 jours de contamination et 30 jours de dépuración, le profil reste le même. En ce qui concerne la masse viscérale, on a apparition d'un pic en sortie de colonne à t1 (< 10 kDa) puis l'apparition de 2 pics au niveau des grosses protéines.

4.2.3. Discussion

Les travaux rapportés dans ce chapitre concernent les processus de bioaccumulation et de dépuración du sélénium dissous chez un modèle bivalve *C. fluminea*. Les mécanismes ont été appréhendés en utilisant 2 formes chimiques de Se, une organique (SeMet) et une inorganique (sélénite) et en analysant la distribution du sélénium depuis le niveau organisme entier jusqu'au niveau subcellulaire.

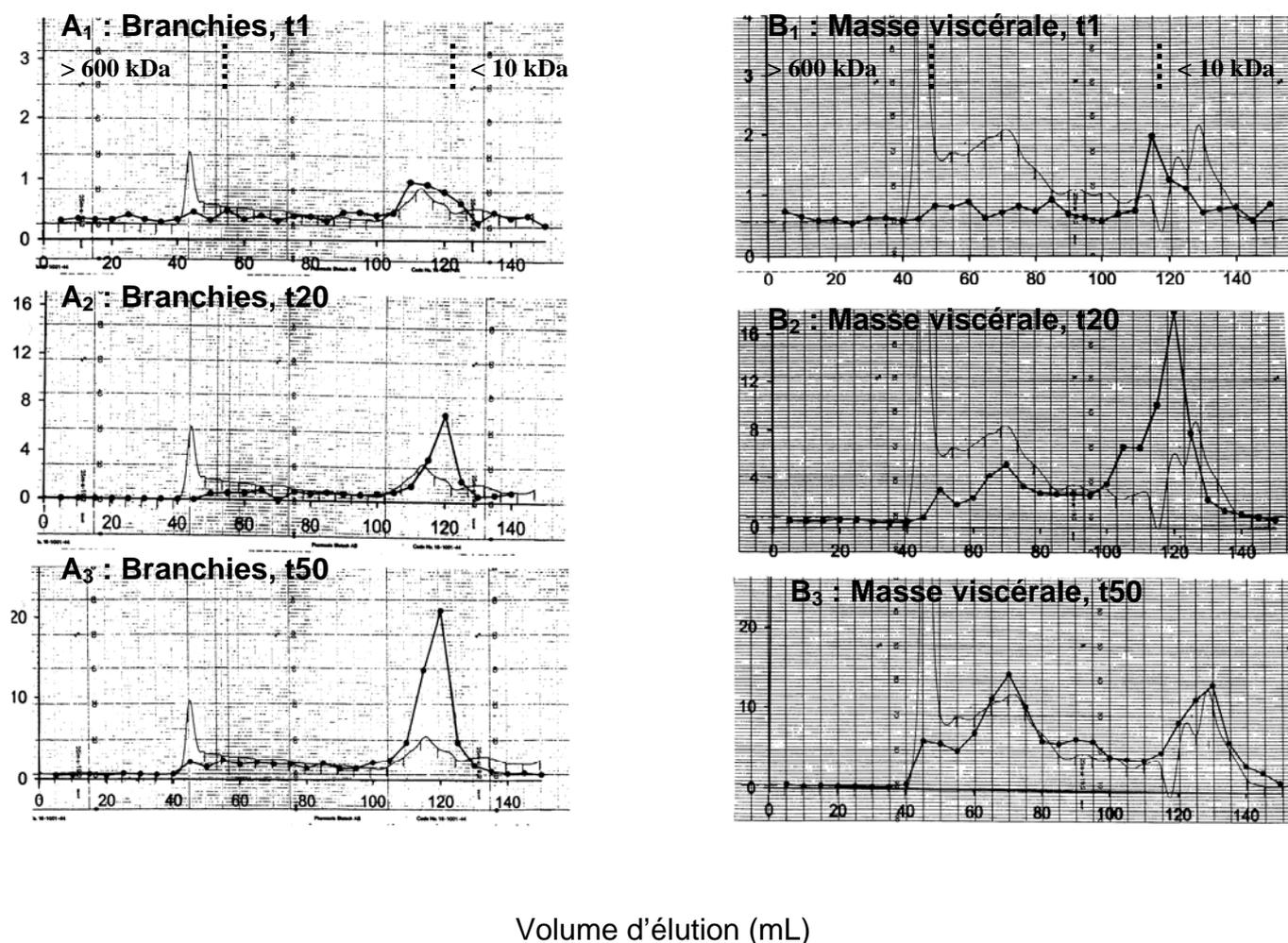


Figure 33 : Répartition du sélénium sur les protéines de la fraction cytosolique après exposition au sélénite. L'axe des abscisses représente le volume d'élution, et l'axe des ordonnées l'intensité du signal associé aux protéines (absorbance) ou au Se (μg). Chromatogrammes (courbe) et dosages du sélénium (points expérimentaux avec courbe) ont été superposés. A : Branchies ; B : Masse viscérale ; t1 : 1 jour d'exposition, t20 : 20 jours d'exposition et t50 : 30 jours de dépuration.

Accumulation et dépuraction de la SeMet et du sélénite

Conformément aux résultats obtenus dans les premiers chapitres, nous avons observé une accumulation de la SeMet beaucoup plus importante que celle du sélénite. Les facteurs de bioconcentration pour l'organisme entier (poids frais) estimés par le modèle sont de 14 pour le sélénite et 480 pour la SeMet. Les cinétiques d'accumulation sont également très différentes entre les 2 formes de Se, ce qui peut indiquer des mécanismes de prise en charge différents. La bioaccumulation de la SeMet est très rapide, tandis que celle du sélénite est beaucoup plus lente. Chez les bivalves, nous n'avons pas trouvé d'information dans la littérature concernant les mécanismes de transport du sélénium. Dans nos conditions, la SeMet pourrait être prise en charge rapidement par analogie avec la Met, comme cela est décrit chez les mammifères (Ducros et Favier, 2004). Il a été montré par des études *in vitro*, que l'absorption de la Met par les branchies du bivalve *Mya arenaria* était réalisée *via* un transport actif (Stewart, 1978). En ce qui concerne le sélénite, il pourrait pénétrer par des canaux anioniques, tels que ceux des nitrates ou sulfates. En ce qui concerne le transport des sulfates, il est relativement lent par rapport à celui des autres ions chez le bivalve d'eau douce *Dreissena polymorpha* (Dietz et Byrne, 1999). Les processus de prise en charge du sélénium ont été étudiés chez des modèles biologiques simples unicellulaires (Riedel *et al.*, 1991; Riedel *et al.*, 1996). Riedel *et al.* (1991) se sont intéressés à la prise en charge du séléniat, sélénite et SeMet par 3 algues *Anabaena flos-aquae*, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Cyclotella meneghiniana*. Ils ont proposé une fixation du sélénite principalement par sorption passive tandis que celle du séléniat et de la SeMet impliquerait plutôt un processus biologique. Par contre, les résultats plus récents de Morlon *et al.* (2005), concernant le transport du sélénite chez *Chlamydomonas reinhardtii* suggèrent un transport de haute affinité mais rapidement saturé à faibles concentrations, de l'ordre du μM , doublé d'un transport de faible affinité qui ne se saturerait qu'à fortes concentrations, de l'ordre du mM . Morlon *et al.* (2005) suggèrent que ce transport pourrait faire intervenir des transporteurs du sulfate ou nitrate, étant donné qu'ils ont observé une inhibition de la prise en charge du sélénite par ces éléments.

Après 50 jours de dépuración, le sélénium, apporté sous forme de sélénite est quasiment totalement dépuré. En revanche, l'élimination est plus lente dans le cas de l'exposition à la SeMet. Etant donné la possible fixation aspécifique de la SeMet sur de nombreuses sélénoprotéines, cette vitesse de dépuración pourrait correspondre au turn-over de certaines protéines. Selon les protéines considérées, la demi-vie varie de quelques heures à plusieurs mois.

Fractionnement subcellulaire du sélénium : implication en termes de toxicité et de transfert trophique

L'étude du fractionnement subcellulaire des métaux/métalloïdes reflète des processus internes qui se produisent pendant l'accumulation du polluant. Elle apporte des informations sur la répartition du contaminant et des éléments d'information pour mieux comprendre les problèmes de toxicité et d'adaptation. La distribution subcellulaire peut également aider à mieux comprendre les problèmes de transfert trophique.

Nous avons montré que la bioaccumulation et la répartition subcellulaire du sélénium différaient selon la forme de Se utilisée (Figure 30). La répartition du sélénium dans les branchies et la masse viscérale des bivalves témoins était homogène entre les fractions soluble et insoluble, alors que chez les organismes exposés à la SeMet, le sélénium se retrouvait essentiellement au niveau de la fraction insoluble, et que chez ceux exposés au sélénite, il se retrouvait essentiellement au niveau du cytosol, après 20 jours de contamination.

En ce qui concerne la SeMet, son accumulation au sein du cytosol et de la fraction insoluble s'est faite rapidement, dès 1 jour de contamination. Une saturation de la fraction cytosolique à 1.2 µg de Se par g d'organe (p.f.) a été observée alors que la part de Se dans la fraction insoluble continuait à augmenter (t20). La bioaccumulation rapide et homogène au sein de la fraction insoluble indique une fixation du sélénium sur l'ensemble des fractions insolubles : sur les granules comme moyen de détoxification, ainsi que sur les organites, débris cellulaires et membranaires par incorporation aspécifique dans des protéines membranaires à la place de la méthionine par exemple. Après 20 jours de contamination à la SeMet, l'augmentation de la part de Se dans la fraction incluant mitochondries et lysosomes peut laisser suggérer la mise en place d'un mécanisme de détoxification impliquant les lysosomes ou une incorporation aspécifique de la SeMet dans les protéines de ses organites. L'incorporation du sélénium dans les mitochondries, après exposition à la SeMet, pourrait entraîner leur mauvais fonctionnement et induire un stress oxydant.

D'une manière générale, la fixation aspécifique de la SeMet sur l'ensemble des protéines (cytosoliques ou non) serait susceptible de créer une toxicité pour le bivalve. En effet, l'un des premiers mécanismes de toxicité du sélénium est la substitution du S par le sélénium, entraînant des modifications de structure tertiaire et d'activité des protéines (Eustice *et al.*, 1981; Schrauzer, 2000; Lemly, 2002b).

En ce qui concerne le sélénite, on observe une augmentation du sélénium essentiellement au niveau de la fraction cytosolique après 20 jours d'exposition. La bioaccumulation de cette forme est moindre par rapport à celle de la SeMet. Chez certaines espèces, les métaux de la fraction cytosolique de la proie sont plus biodisponibles que ceux de la fraction insoluble. Schletat *et al.* (2002) montrent que l'efficacité d'assimilation par le bivalve *Macoma balthica* est proportionnelle à la quantité de Se présente dans la fraction cytosolique des cellules algales ingérées. Ceci a également été montré chez plusieurs autres bivalves marins nourris avec des algues contaminées en Se (Reinfelder *et al.*, 1997). Par contre, ce phénomène reste dépendant des organismes étudiés et du polluant concerné.

En ce qui concerne les transferts entre consommateurs, peu d'études ont été réalisées. Il a été montré que l'efficacité d'assimilation du sélénium entre le copépode *Acartia sp.* (exposé au ⁷⁵Sélénite) et le poisson juvénile *Menidia sp.* n'était que de 29 % (Reinfelder et Fisher, 1994) mais que ceci était lié au fait que le ⁷⁵Sélénite s'accumulait à 60 % dans l'exosquelette des copépodes qui n'est pas assimilé par le poisson. D'une manière générale, la fraction cytosolique est associée à une fraction biologiquement active, soit en termes de toxicité, soit en termes de biodisponibilité par la voie trophique. Ceci peut nous laisser imaginer un transfert trophique important du sélénite (ou une bonne extraction) ou bien une toxicité importante de cette forme qui se retrouve essentiellement au niveau de la fraction soluble. L'analyse des résultats concernant la phase d'élimination, indique que le sélénium apporté sous forme de sélénite était quasi totalement éliminé après 30 jours dans les 2 fractions, alors que celui apporté sous forme de SeMet était encore très présent dans la fraction cytosolique et la fraction insoluble, la dépuración ayant essentiellement concerné la fraction insoluble. Ainsi, la quantité de Se bioaccumulée dans le cytosol à partir de SeMet est beaucoup plus importante et rémanente que celle accumulée à partir du sélénite. La toxicité et biodisponibilité de la SeMet vers les maillons trophiques supérieurs ne doit donc pas être négligée.

Répartition du sélénium sur les protéines cytosoliques

Nous avons étudié la distribution du sélénium dans 2 organes du bivalve *C. fluminea*, en utilisant la chromatographie par exclusion de taille pour estimer le poids moléculaire des composés séléniés. Nous avons démontré la présence de sélénoprotéines de haut poids moléculaire et des composés séléniés de faible poids moléculaire (< 10 kDa) dans la masse viscérale de *C. fluminea* après une exposition à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sélénite et de SeMet. De plus, dans le cas de la SeMet, le sélénium a été retrouvé dans toutes les fractions d'élution, ce qui indique qu'il peut se fixer sur de très nombreuses protéines. Dans les branchies, après exposition à la SeMet, le sélénium s'incorpore dans de très nombreuses protéines alors qu'après exposition au sélénite, il se retrouve uniquement parmi les petits composés séléniés (< 10 kDa). La présence de Se dans toutes les fractions d'élutions des deux organes de *C. fluminea* exposés à la SeMet, suggère encore une fois l'incorporation aspécifique de la SeMet à la place de la méthionine dans de très nombreuses protéines. Le pic observé en fin de colonne, correspondant à des composés séléniés de faible poids moléculaire, pourrait correspondre à de la SeMet libre dans le cytosol ou bien des métabolites.

De même, dans le cas des bivalves exposés au sélénite, les composés séléniés de poids < 10 kDa pourraient être du sélénite libre dans le cytosol, qui aurait diffusé depuis le milieu extérieur, ou bien des métabolites tels que le sélénodiglutathion, le séléniure d'hydrogène ou encore la SeCyst. Aux temps, t20 et t50, des protéines séléniées de haut poids moléculaire (2 pics essentiellement) apparaissent dans la masse viscérale de *C. fluminea* exposés au sélénite. Chez l'animal, le sélénite est généralement réduit et incorporé de façon post-traductionnelle dans des protéines spécifiques, telles que la glutathion peroxydase ou la thioredoxine réductase (Ganther, 1999; Arteel et Sies, 2001; Ducros et Favier, 2004). Ce phénomène pourrait se produire au sein de la masse viscérale de *C. fluminea*, tandis qu'au sein de la branchie, qui est un organe de transit, il n'y aurait pas d'activation métabolique du sélénite. De plus, on constate qu'il y a beaucoup moins de grosses protéines dans les branchies que dans la masse viscérale. Des données concernant les espèces séléniées présentes dans les fractions protéiques de tissus biologiques lyophilisés peuvent être trouvées dans la littérature (Moreno *et al.*, 2004). Ces espèces ont été caractérisées par chromatographie d'exclusion stérique et d'échange cationique, couplées à un ICP-MS.

Dans les échantillons d'huîtres et de moules, ces auteurs trouvent la présence de protéines de haut poids moléculaire (150-50 kDa) et des composés de faible poids moléculaire (< 5 kDa). Ces auteurs ont analysé les produits de digestion enzymatique des fractions solubles et insolubles par chromatographie d'échange cationique et trouvent la présence de triméthylsélénonium et de SeMet.

Etant donné que la biodisponibilité et la toxicité du sélénium sont étroitement corrélées à la forme chimique ingérée, la connaissance des espèces chimiques du sélénium dans le bivalve permettrait d'évaluer son transfert vers les maillons trophiques supérieurs. La caractérisation des différents composés séléniés dans les tissus de *C. fluminea*, pourrait être améliorée en utilisant des colonnes plus sélectives en termes de taille. De plus, il serait intéressant d'identifier et de quantifier les espèces séléniés inorganiques et organiques après digestion enzymatique. Cette caractérisation des espèces séléniées pourrait également être envisagée chez les algues afin d'appréhender les formes chimiques de Se impliquées dans son transfert au bivalve.

4.2.4.Principales avancées et conclusions

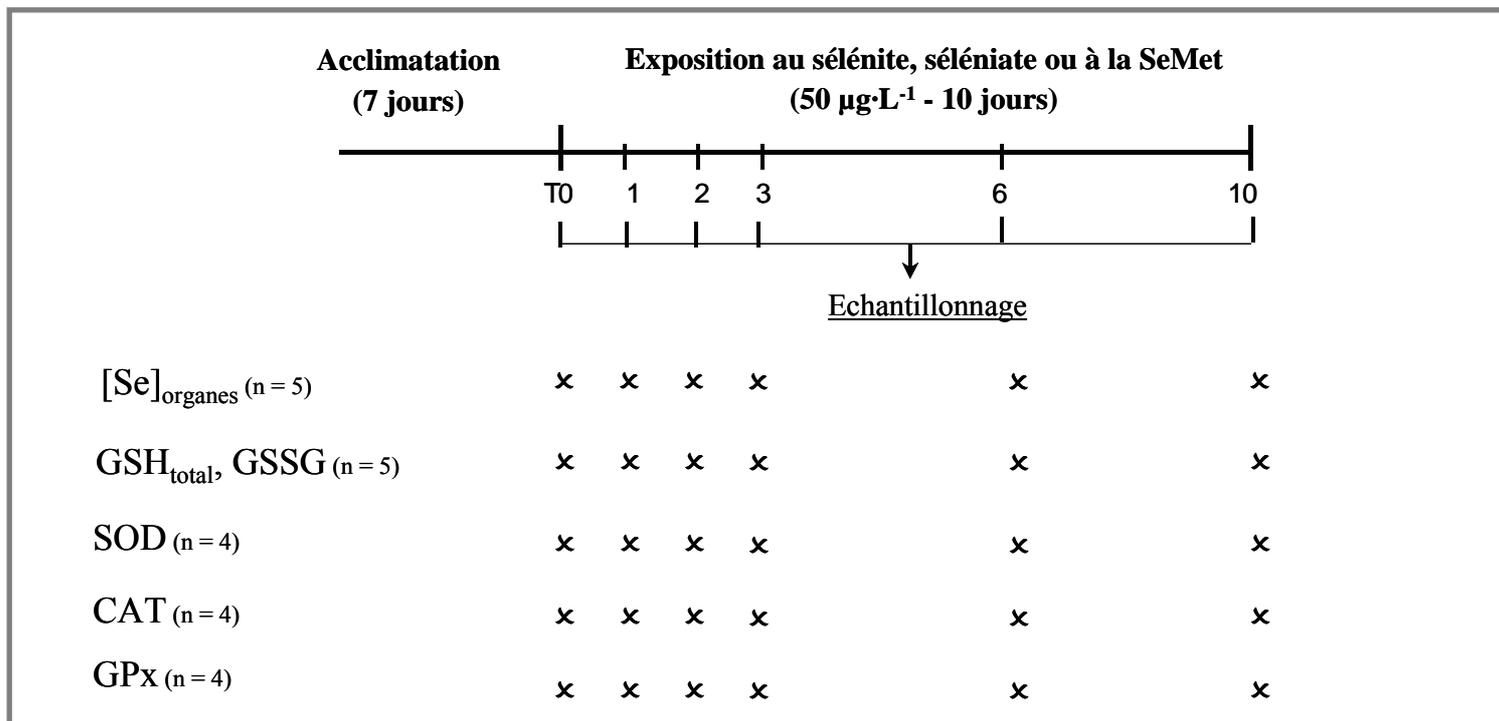
Il a été montré que le sélénite et la SeMet présentait des biodisponibilités différentes. Le sélénite, qui est la forme majoritaire rencontrée dans le milieu aquatique, est aussi la forme la moins bioaccumulée. La SeMet, quant à elle, fait partie des formes organiques, elle est donc minoritaire dans les milieux aquatiques naturels, cependant elle ne doit pas être négligée étant donné sa forte biodisponibilité et sa rémanence dans les tissus une fois qu'elle est incorporée.

La répartition du sélénium au sein des fractions solubles et insolubles des tissus branchiaux et viscéraux est largement dépendante des formes de Se apportées, le sélénite s'incorporant essentiellement au niveau du cytosol et la SeMet s'incorporant au niveau du cytosol mais aussi de la fraction insoluble.

Au sein du cytosol, leur répartition moléculaire est également différente. Après exposition à de la SeMet, le sélénium est incorporé dans de très nombreuses protéines cytosoliques, alors que l'incorporation du sélénite semble restreinte à certains groupes protéiques. Un important travail reste à faire quant à l'identification des espèces séléniées présentes dans les tissus de *C. fluminea*. Au sein de la fraction insoluble, l'augmentation de la part de Se dans la fraction incluant les mitochondries pourrait entraîner un mauvais fonctionnement de ces organites. Leur ultrastructure après exposition au Se sera analysée dans le chapitre suivant (§ 4.3.3).

D'une manière générale, les différences de répartitions subcellulaires observées laissent suggérer des toxicités et transferts trophiques différents du sélénite et de la SeMet. Cette partie toxicité sera abordée dans le chapitre suivant.

A : Déroulement de l'expérience, nature et fréquence des analyses :



B : Conditions expérimentales

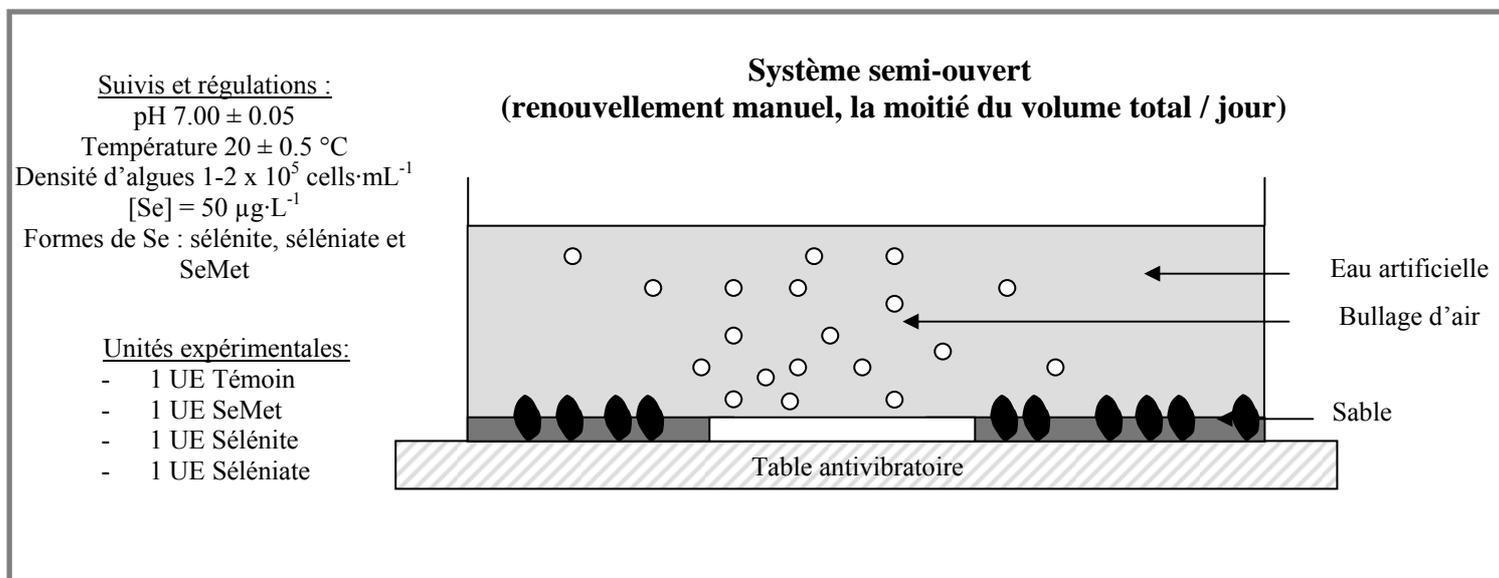


Figure 34 : Déroulement (A) et conditions (B) de l'expérience sur le statut antioxydant des bivalves après exposition au sélénium.

4.3. Toxicité subcellulaire du sélénium

Dans les chapitres précédents, nous avons montré que le sélénite et la SeMet apportés par la voie directe pouvaient modifier le comportement ventilatoire de *C. fluminea*, en traduisant des effets protecteurs potentiels (§ 4.1.1), et que ces deux formes avaient des biodisponibilités, bioaccumulations et répartitions subcellulaires très différentes (§ 4.2). Ces observations laissent donc supposer une toxicité du sélénium variable en fonction des formes. Nous avons voulu dans ce chapitre, étudier si ces effets et caractéristiques macroscopiques, pouvaient être associés à des effets toxiques observables aux niveaux cellulaires et/ou moléculaires. Nous avons tout d'abord recherché, par des analyses biochimiques, les marqueurs classiques du stress oxydant, puis nous avons étudié l'effet au niveau de l'expression de gènes et enfin au niveau de l'ultrastructure des cellules branchiales.

4.3.1. Suivi du statut anti-oxydant de *C. fluminea* lors d'une exposition au Se

4.3.1.1. Introduction

Le but de ces études était d'analyser si une exposition au Se, apporté sous différentes formes chimiques était susceptible d'altérer le statut antioxydant de *C. fluminea*.

Nous avons analysé certains biomarqueurs du stress oxydant chez *C. fluminea* exposé à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Se, apporté sous 3 formes (sélénite, séléniate, SeMet) et pour des durées d'exposition comprises entre 1 et 10 jours. Les prélèvements réalisés et les conditions expérimentales sont résumées dans la Figure 34. Des analyses statistiques des résultats ont été réalisées sur l'ensemble des biomarqueurs mesurés (teneurs en protéines, activités superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GPx), catalase (CAT), teneurs en glutathion total ($\text{GSH}_{\text{total}}$) et en glutathion oxydé (GSSG)).

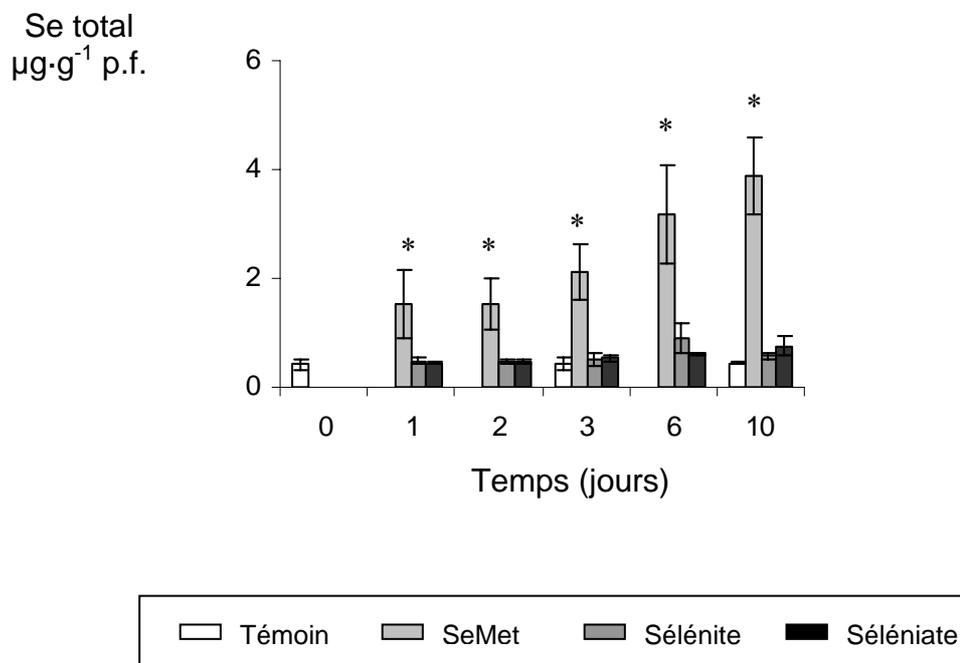


Figure 35 : Accumulation du sélénium dans le corps mou entier de *C. fluminea* au cours des 10 jours d'exposition à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Se, sous forme de SeMet, sélénite ou séléniate (moyenne \pm écart type, $n = 5$). Résultats statistiquement significatifs : * par rapport au groupe témoin t_0 ($p < 0.05$).

4.3.1.2. Résultats

Bioaccumulation des différentes formes de sélénium chez C. fluminea

Nous avons représenté sur la Figure 35, l'évolution des concentrations en Se total au cours du temps dans le corps mou entier de *C. fluminea*.

Les concentrations en sélénium total ne varient que chez les bivalves exposés à la SeMet où elles augmentent au cours du temps. Les accumulations de sélénite et séléniate sont très faibles et non significatives.

Mesures de biomarqueurs

L'ensemble des résultats concernant les biomarqueurs est présenté graphiquement sur la Figure 36. Les moyennes ont été comparées par des analyses multivariées (MANOVA) avec le traitement (la forme de sélénium ou la durée d'exposition) pris comme variable indépendante. Des analyses de variance (ANOVA) sont ensuite réalisées afin de déterminer la contribution de l'effet individuel de chaque marqueur biochimique sur l'effet global indiqué par la MANOVA. Lorsqu'un effet significatif du traitement est indiqué, des comparaisons post-hoc à l'aide de tests LSD ont été effectuées afin de connaître les groupes significativement différents des témoins. Les corrélations entre les différentes réponses biochimiques et les teneurs en sélénium dans les tissus des bivalves ont été déterminées à l'aide du coefficient de corrélation de Pearson.

Effet de la durée d'exposition :

L'objectif est de déterminer si les variations des biomarqueurs sont dépendantes du facteur temps. Cette analyse a été effectuée pour les 4 groupes : témoin, SeMet, sélénite et séléniate. La comparaison a été réalisée entre les durées t1, t2, t3, t6 et t10 et le groupe témoin t0.

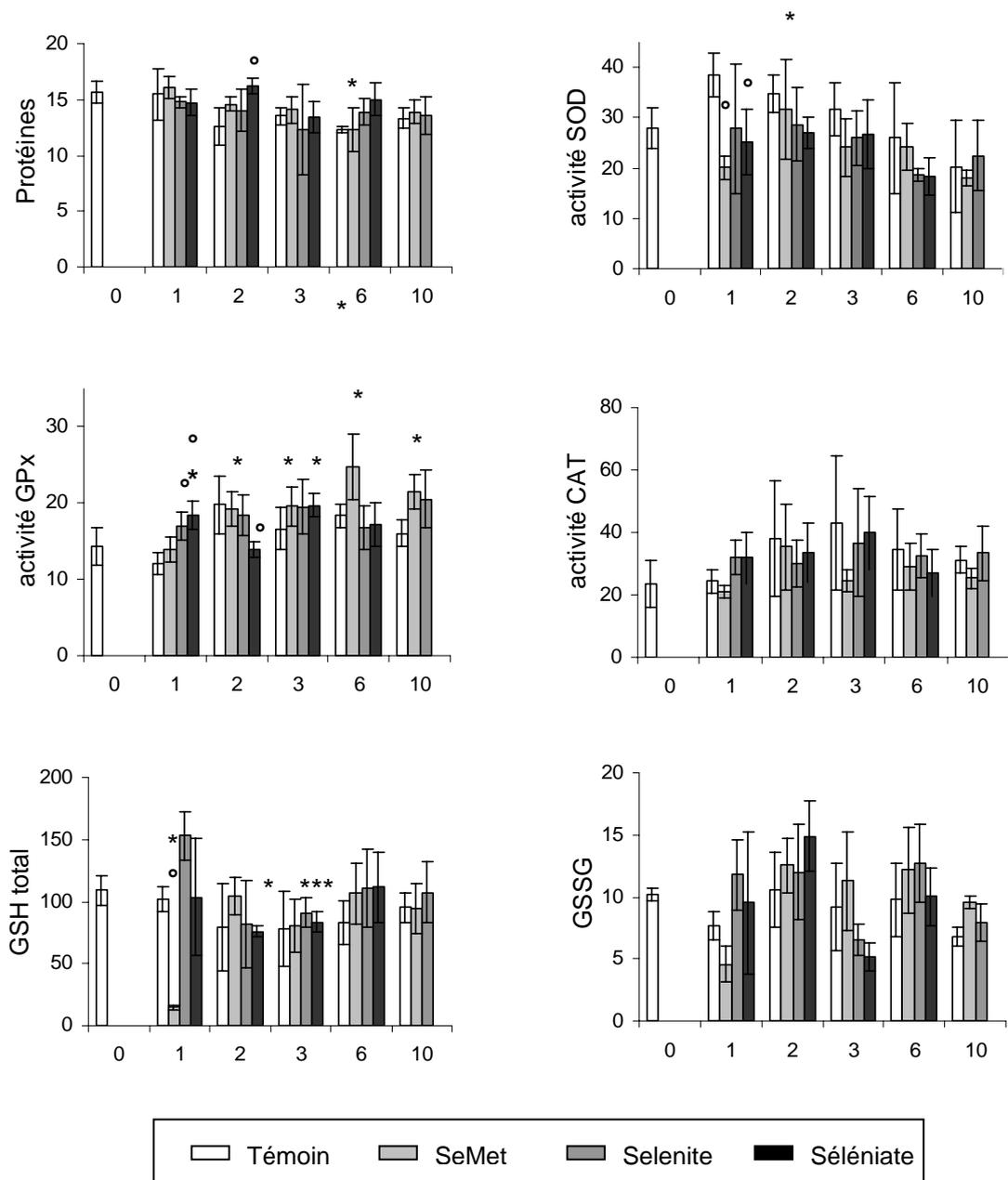


Figure 36 : Résultats des dosages des biomarqueurs chez *C. fluminea* exposés à 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sélénium (moyenne \pm écart type). GPx : glutathion peroxydase, CAT : catalase, GSH : glutathion, GSSG : glutathion oxydé. Les protéines sont exprimées en $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, les activités sont exprimées en $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines excepté l'activité CAT en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines, les teneurs en glutathion en $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ de tissu frais. Résultats statistiquement significatifs : * par rapport au groupe témoin T0, °: par rapport au groupe témoin à la même durée d'exposition ($p < 0.05$).

- Sur les témoins :

Le test multivarié de significativité réalisé sur l'ensemble des biomarqueurs ne met pas en évidence d'effet significatif de la durée d'exposition sur les animaux témoins ($p > 0.05$).

- Sur les bivalves exposés à la SeMet :

Le test multivarié de significativité réalisé sur l'ensemble des biomarqueurs met en évidence un effet significatif de la durée d'exposition sur les animaux exposés à la SeMet ($p < 0.05$). L'effet de la durée est significatif pour les teneurs en protéines et en GSH_{total}, et les activités SOD et GPx. La teneur en protéines semble diminuer après 3 jours d'exposition, et est significativement plus faible à t6. Le taux de glutathion total est significativement plus faible à t1 et t3. L'activité SOD augmente de façon significative à t2 puis diminue pour les autres durées d'exposition. L'activité GPx augmente de façon significative avec la durée d'exposition à partir de t2.

- Sur les bivalves exposés au sélénite :

Le test multivarié de significativité réalisé sur l'ensemble des biomarqueurs ne met pas en évidence d'effet significatif de la durée d'exposition sur les animaux exposés au sélénite ($p > 0.05$).

- Sur les bivalves exposées au séléniate :

Le test multivarié de significativité réalisé sur l'ensemble des biomarqueurs met en évidence un effet significatif de la durée d'exposition sur les animaux exposés au séléniate ($p < 0.05$). Si l'on réalise un test univarié de significativité pour chaque biomarqueur, l'effet de la durée est significatif pour l'activité GPx, qui est plus élevée pour les temps t1 et t3, et pour le taux de glutathion total qui est plus faible aux jours 2 et 3.

Effet de la forme du sélénium

L'objectif est de déterminer si les variations des biomarqueurs dépendent de la forme de sélénium à laquelle ils sont exposés. Cette analyse a été effectuée pour les différentes durées d'exposition : t1, t2, t3, t6 et t10. La comparaison a été réalisée entre les groupes exposés à la SeMet, sélénite et séléniate et le groupe témoin de la même durée d'exposition.

- Pour le temps t1 :

Le test multivarié de significativité réalisé sur l'ensemble des biomarqueurs met en évidence un effet significatif des différentes formes du sélénium. Si l'on réalise un test univarié de significativité pour chaque biomarqueur, on observe un effet significatif du sélénium sur SOD, GPx et GSH_{total}. Les activités SOD des bivalves exposés à la SeMet et au séléniate sont significativement plus faibles que celles du témoin. Les activités GPx des bivalves exposés au sélénite et au séléniate sont significativement plus élevées que celles du témoin. La teneur en GSH_{total} des bivalves exposés à la SeMet est significativement plus faible.

- Pour le temps t2 :

Le test multivarié de significativité réalisé sur l'ensemble des biomarqueurs met en évidence un effet significatif des différentes formes du sélénium. Si l'on réalise un test univarié de significativité pour chaque biomarqueur, l'effet du produit est significatif pour la teneur en protéines et l'activité GPx. Les bivalves exposés au séléniate présentent des teneurs en protéines significativement plus élevées et des activités GPx significativement plus faibles que celle des témoins.

- Pour les temps t3, t6 et t10 :

Les tests multivariés de significativité réalisés sur l'ensemble des biomarqueurs ne mettent pas en évidence d'effet significatif des différentes formes du sélénium à ces durées d'exposition.

Corrélations entre biomarqueurs et corrélations entre teneurs en sélénium dans les tissus et variations des biomarqueurs

L'objectif est de déterminer si les variations des biomarqueurs sont dépendantes de la dose de sélénium accumulée dans les tissus des animaux. Les teneurs en sélénium dans les tissus ne varient que chez les bivalves exposés à la SeMet. L'étude des corrélations n'a donc porté que sur ce groupe. On observe des corrélations entre les teneurs en sélénium dans les tissus des bivalves et les activités GPx (0.58) et SOD (-0.44). On note également des corrélations entre certains biomarqueurs : les teneurs en GSH_{total} et en GSSG (0.68), GSSG et activité CAT (0.48), GSH total et activité GPx (0.47), et GSSG et activité SOD (0.42).

4.3.1.3. Discussion

Les quantités de SeMet accumulées par les bivalves lors de cette expérimentation sont légèrement plus faibles que celles observées lors des expériences précédentes (§ 4.1.1 ; § 4.2). Cependant les facteurs de concentration (FC) restent du même ordre de grandeur. Pour le sélénite, les accumulations sont comparables. Les FC obtenus après 3 jours d'exposition ont été calculés pour les 3 expérimentations. Les résultats indiquent que :

- En ce qui concerne la SeMet, lors de la première expérience (§ 4.1.1) $FC_{3j} = 61 \pm 46$; lors de la deuxième expérience (§ 4.2) $FC_{3j} = 95 \pm 21$ et lors de celle-ci $FC_{3j} = 36 \pm 12$.
- En ce qui concerne le sélénite, lors de la première expérience (§ 4.1.1) $FC_{3j} = 2.5 \pm 0.5$; lors de la deuxième expérience (§ 4.2) $FC_{3j} = 2.3 \pm 1.5$ et lors de celle-ci $FC_{3j} = 3.5 \pm 2.8$.

La variabilité des facteurs de concentration après 3 jours de contamination est moindre dans le cas du sélénite et plus important dans le cas de la SeMet. Cette variabilité peut être attribuée à des facteurs naturels (liés aux caractéristiques des populations) ou expérimentaux (liés à l'efficacité du maintien de la pression de contamination par exemple).

Les variations des différents biomarqueurs en fonction de la durée d'exposition et de la forme du sélénium apportée sont faibles et difficilement interprétables car aucune tendance nette ne se dégage. Cependant l'analyse statistique des résultats qui a été effectuée concernant les mesures de ces biomarqueurs indique que les principaux biomarqueurs significativement affectés sont les activités SOD et GPx et le taux de GSH_{total} qui diminue, en particulier pour les courtes durées d'exposition, dans le cas d'expositions à la SeMet, et dans une moindre mesure, au séléniate. Seuls les bivalves exposés à la SeMet ont accumulé significativement du sélénium dans leurs tissus. Dans ce cas, de faibles corrélations sont mises en évidence entre la concentration en sélénium dans les tissus et les activités GPx et SOD. Ainsi, les effets observés pourraient être liés à la forme de Se ou bien à la quantité de Se internalisé. Des corrélations entre biomarqueurs sont également observées, notamment entre le système glutathion et la GPx, ce qui était prévisible.

Les principales modifications de statut anti-oxydant ont lieu chez les bivalves exposés à la SeMet (chute de la SOD et du GSH_{total} après 1 jour d'exposition puis augmentation de la GPx au cours du temps). Nous avons montré précédemment que la SeMet pouvait être détectée très rapidement par *C. fluminea* (§ 4.1.1). Après un jour d'exposition à 50 µg·L⁻¹ de SeMet, les bivalves avaient diminué leur débit ventilatoire d'un facteur 8. Cette réponse ventilatoire avait été interprétée comme un mécanisme de protection face à la SeMet, qui pourrait être toxique pour *C. fluminea*. Ainsi, les effets précoces observés sur le statut anti-oxydant de *C. fluminea* après exposition à la SeMet peuvent être assimilés à une toxicité de cette forme de Se entraînant un léger stress oxydant chez le bivalve. Par contre, l'exposition au sélénite n'a pas généré de stress oxydant chez le bivalve, même si nous avons vu précédemment que cette forme entraînait une hyperventilation des bivalves (l'hyperventilation aurait pu produire une sur-oxygénation des tissus et donc une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène).

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'études relatant les effets du sélénium sur les enzymes du statut antioxydant chez le bivalve. Cependant, plusieurs études ont été menées sur d'autres organismes et relatent un effet toxique du sélénium lié à un stress oxydant.

Par des études en laboratoire, Zhang *et al.* (2005) ont montré que la toxicité du sélénium dépendait de la dose mais aussi de la forme chimique de Se considérée. Ainsi, le sélénite présentait une toxicité plus importante que Se(0) pour la souris. Ils observent dans le foie de souris, après administration de sélénite (4 mg·kg⁻¹ par jour pendant 15 jours), une diminution de la catalase et de la superoxyde dismutase, une augmentation de la peroxydation lipidique par dosage de la malonaldéhyde A ainsi qu'une diminution du glutathion et parallèlement, une augmentation des glutathion peroxydase et transférase. Les modifications de ces marqueurs sont le signe d'un stress oxydant après exposition au sélénite.

Stewart *et al.* (1999), ont montré que le sélénium administré à des cellules de souris pouvait induire un stress oxydant et l'apoptose, ces phénomènes étant largement dépendants des formes étudiées. Ils ont montré sur des cultures cellulaires de kératinocytes de souris, que le sélénite et la sélénocystamine créaient des adduits à l'ADN, de l'apoptose et qu'ils étaient cytotoxiques (100 % d'apoptose était observée après exposition à 25 mg·L⁻¹ de sélénite ou 250 mg·L⁻¹ de sélénocystamine). Par contre, aucun de ces effets n'a été observé après exposition à la SeMet.

Par contre, Palace *et al.* (2004) montrent que l'un des métabolites de la SeMet peut engendrer un stress oxydant chez l'embryon de truite. Ce métabolite, le méthylsélénol, induirait la formation de superoxyde en présence de glutathion.

Plusieurs cas de toxicité du sélénium dans les écosystèmes aquatiques ont été rapportés dans la littérature. Des effets tératogènes ont été observés chez des poissons dans le lac Belews (Lemly, 1993b) et chez les oiseaux dans le réservoir de Kesterson en Californie (Spallholz et Hoffman, 2002). Spallholz et Hoffman (2002) présentent la toxicité du sélénium comme pouvant être due à plusieurs mécanismes :

- la formation de superoxydes par certains composés séléniés entraînant un stress oxydant.
- l'excès de SeCyst qui inhiberait la méthylation du sélénium et donc créerait un excès de H₂Se qui s'accumulerait dans l'organisme. Ceci aboutirait à des effets hépatotoxiques.
- enfin, une fixation de Se sur de nombreuses protéines par analogie avec le soufre qui pourrait créer un effet tératogène.

D'une manière générale, la toxicité du sélénium semble liée à sa métabolisation et à la génération d'un stress oxydant. Dans nos conditions expérimentales et sur les marqueurs étudiés l'effet du sélénium apparaît faible et restreint à la forme organique, SeMet. Cependant, nous avons travaillé sur organisme entier, ce qui peut avoir « masqué » un stress oxydant qui aurait eu lieu dans un organe ou un type cellulaire précis. Des études à des doses différentes ou sur un type cellulaire précis pourraient permettre d'aller plus en avant dans l'étude de ces mécanismes.

4.3.1.4. Conclusion

Les principaux biomarqueurs qui sont affectés sont les activités SOD, GPx et la teneur en GSH_{total} et le sont par la SeMet. La durée d'exposition a un effet significatif sur les variations des biomarqueurs étudiés chez les bivalves exposés à la SeMet et, dans une moindre mesure, au séléniate. La forme de sélénium apportée a un effet significatif sur les variations des biomarqueurs aux temps précoces. De faibles corrélations sont observées entre les teneurs en sélénium dans les tissus et les activités GPx et SOD chez les bivalves exposés à la SeMet.

En conclusion, les différentes formes de sélénium étudiées entraînent des altérations des mécanismes du stress oxydant d'intensité faible chez *C. fluminea*, en particulier des activités SOD, GPx et du taux de glutathion total, et ces modifications se produisent à des temps précoces. Ces effets, principalement observés après exposition à la SeMet, peuvent être liés à la forme de Se ou à la quantité de Se internalisée.

4.3.2. Effet du sélénium sur l'expression de gènes

Dans le paragraphe précédent, nous avons vu que les différentes formes de sélénium étudiées entraînaient des altérations faiblement détectables des systèmes antioxydants de *C. fluminea* au niveau du corps mou entier. Cependant, le stress oxydant se produit généralement dans un tissu et un type cellulaire bien précis, objet de la défaillance et non pas dans tout l'organisme. Ainsi, pour les expériences qui ont suivi, l'impact du sélénium a été évalué au niveau des branchies uniquement, car il s'agit de l'organe cible de la bioaccumulation du sélénium par la voie directe et que son activité de ventilation peut être modifiée en présence de sélénium. Dans ce paragraphe, l'expression génétique de protéines pouvant être induites lors d'un stress oxydant a été analysée. Ces analyses nécessitent moins de matière biologique que les analyses biochimiques, et sont donc envisageables sur un organe isolé.

4.3.2.1. *Introduction*

L'objectif de cette étude était de voir si le sélénium pouvait induire ou réprimer l'expression de certains gènes au niveau des branchies. Les gènes étudiés sont celui de la cytochrome c oxydase 1 (*coxI*), qui est une protéine jouant un rôle clé dans la phosphorylation oxydative ; celui de la métallothionéine 1 (*mt1*), protéine soluble de faible poids moléculaire possédant une grande quantité de Cyst ayant une fonction d'homéostasie du Cu et du Zn, une fonction de détoxification des métaux et une fonction de protection des cellules face au stress oxydant ; celui de la titine (*tit*), qui est une protéine musculaire élastique dont la surexpression a été observée chez le bivalve en conditions hypoxiques lorsque la ventilation est stimulée ; et celui de la protéine ribosomique S9 (*rpS9*), protéine constituante de la sous-unité du ribosome dont des fonctions extraribosomales de protection vis à vis du stress oxydant ont été rapportées (§ 2.1.2.5).

Nombre de copies
par μg d'ARNm

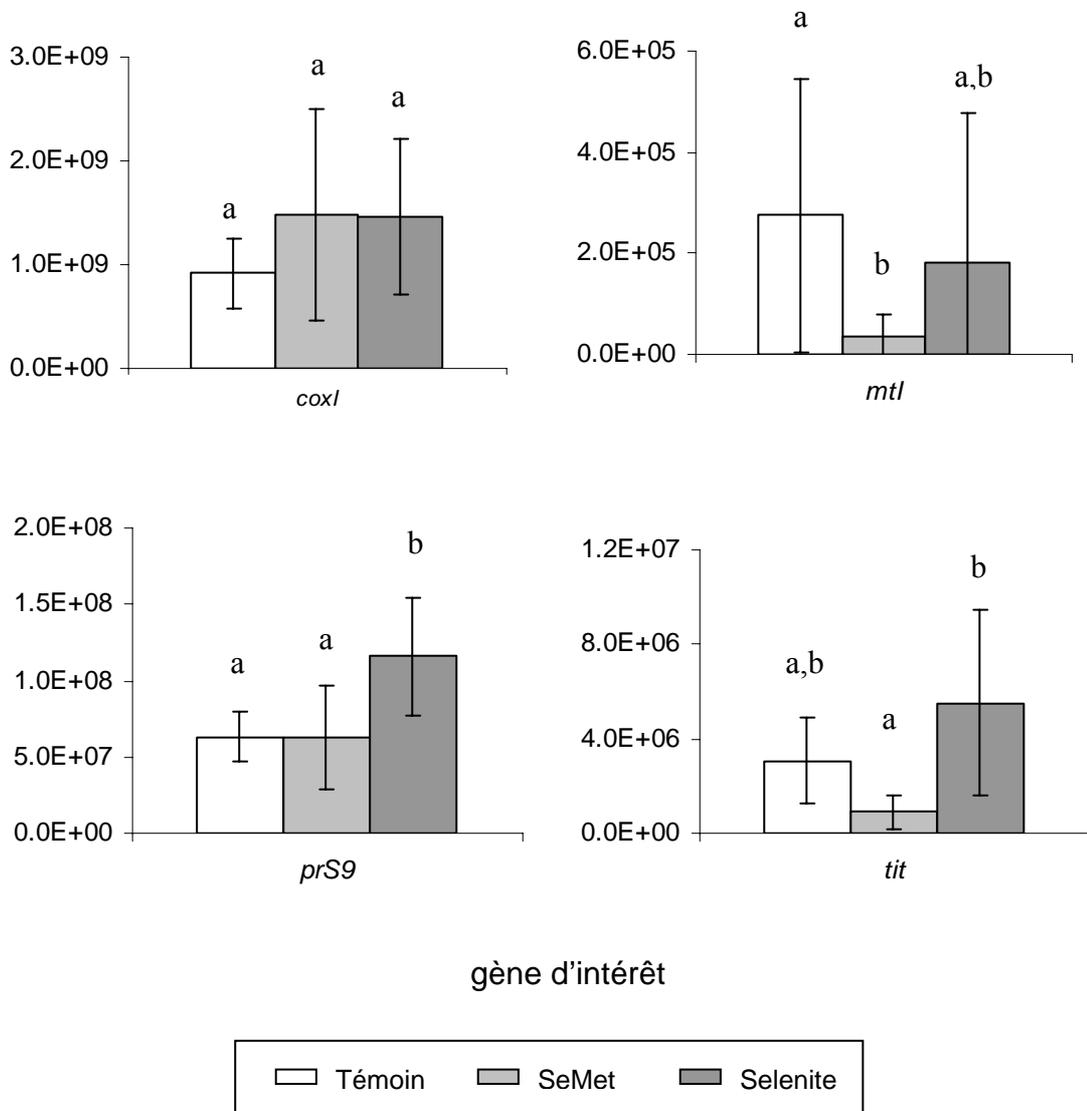


Figure 37 : Expression de gènes (nombre de copies par μg d'ARNm) au niveau des branchies de *C. fluminea* après 20 jours d'exposition à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sélénite ou de SeMet (moyenne \pm écart-type, $n = 3$). *coxI* : gène de la cytochrome c oxydase 1; *mtI* : gène de la métallothionéine 1; *rpS9* : gène de la protéine ribosomique S9 ; *tit* : gène de la titine. Les groupes désignés par une même lettre ne sont pas statistiquement différents ($p < 0.05$)

Les mesures d'expression génétique ont été réalisées après 20 jours d'exposition à 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sélénite ou de SeMet. Les organismes ($n = 3$) ont été prélevés lors de l'expérimentation sur la caractérisation de la bioaccumulation (§ 4.2), dont les conditions expérimentales générales avaient été présentées dans la Figure 25.

4.3.2.2. Résultats

L'expression (nombre de copies par μg d'ARNm) des gènes d'intérêt au niveau des branchies de *C. fluminea* exposés au sélénite ou à la SeMet est présentée sur la Figure 37.

En ce qui concerne le gène de la *mtI*, il est réprimé après 20 jours d'exposition à la SeMet. Le gène *rpS9* est surexprimé dans le cas de l'exposition au sélénite. En ce qui concerne *tit*, une différence significative est trouvée entre le groupe exposé au sélénite et le groupe exposé à la SeMet, cependant il n'y a pas de différence significative avec le groupe témoin. Le gène *coxI* semble un peu plus exprimé pour les bivalves exposés à chacune des formes de sélénium mais aucune différence significative n'a été trouvée par rapport au témoin.

4.3.2.3. Discussion

Les résultats montrent une modification de l'expression génétique chez *C. fluminea* après 20 jours d'exposition au sélénium. Cependant, ces inductions ou répressions de gènes restent faibles et les variations inter-individuelles élevées.

Une surexpression significative du gène *rpS9* a été observé chez les bivalves exposés au sélénite. Une surexpression de *rpS9* a déjà été observée chez *C. fluminea* après exposition à un polluant hautement toxique, le cadmium (Achard-Joris *et al.*, 2005). Ces auteurs suggèrent que cette protéine pourrait être impliquée dans la réparation de l'ADN. En effet, son implication dans le système de réparation SOS a déjà été montré chez *E. coli* (Wool, 1996). Un rôle vis à vis de la protection contre le stress oxydant dans des cellules neuronales de rat lui a également été attribué (Kim *et al.*, 2003). Ainsi, une surexpression de ce gène pourrait donc être signe d'une toxicité du sélénite pour *C. fluminea*.

En présence de SeMet nous observons une répression du gène *mtI* par rapport au témoin. L'induction du gène de la métallothionéine se fait *via* la libération du zinc par la métallothionéine. La répression du gène *mtI* observée pourrait donc être due au blocage de l'induction de ce gène. Ce blocage pourrait être causé par une fixation de la SeMet sur la métallothionéine empêchant le relargage du zinc ou par une précipitation du sélénium avec les métaux essentiels au niveau du cytosol, et notamment avec le Zn, empêchant ainsi le zinc d'aller induire les métallothionéines. Une autre hypothèse, pourrait être un problème au niveau des facteurs de transcription. De nombreux facteurs de transcription sont composés de protéines à doigt de zinc (Cyst₂His₂). Une inhibition de l'interaction entre l'ADN et ces protéines par le sélénite a déjà été rapportée dans la littérature (Larabee *et al.*, 2002). Un encombrement de ces facteurs de transcription (riches en Cyst) par la SeMet ou l'un de ses métabolites pourrait être envisagé.

L'expression de *tit* tend à être plus faible dans le cas des bivalves exposés à la SeMet et est beaucoup plus importante dans le cas des bivalves exposés au sélénite, ce qui entraîne une différence significative entre ces 2 conditions. Achard (en préparation) a observé une augmentation de l'expression de ce gène dans des conditions hypoxiques où la ventilation est stimulée. L'augmentation de l'expression de ce gène peut donc être liée à la différence d'activité ventilatoire du bivalve entre ces 2 situations. Effectivement, nous savons *via* une expérience de 3 jours (§ 4.1) que la ventilation de *C. fluminea* est stimulée par la présence de sélénite et diminue par la présence de SeMet. Cette protéine étant impliquée dans l'étirement musculaire, elle pourrait traduire une différence de fatigue de muscles participant à l'activité ventilatoire.

4.3.2.4. *Conclusions*

Les deux formes de sélénium, sélénite et séléniate, ont induit des modifications d'expression génétiques chez *C. fluminea* après 20 jours d'exposition.

Nous avons observé une répression de l'expression de *mtI* suite à une exposition à la SeMet. Une explication indirecte probable, pourrait être une précipitation du sélénium avec le Zn dans le cytosol, empêchant ainsi l'induction de la synthèse des métallothionéines.

La différence d'expression de la *tit* entre bivalves exposés au sélénite et bivalves exposés à la SeMet pourrait être corrélée à la différence d'activité ventilatoire entre les bivalves, induisant des activités musculaires différentes. Enfin, la surexpression du gène *rpS9* après exposition au sélénite pourrait être signe d'une toxicité de cette forme pour *C. fluminea*.

4.3.3. Effet d'une exposition au Se sur l'ultrastructure des cellules branchiales de *C. fluminea*

4.3.3.1. Introduction

Nous avons vu dans les paragraphes précédents que le sélénium pouvait modifier le comportement ventilatoire de *C. fluminea*, mais aussi induire des modifications biochimiques et/ou génétiques lors d'une exposition au sélénite ou à la SeMet par voie directe. Ces modifications peuvent être signe d'un stress oxydant au niveau des tissus de *C. fluminea*.

Des modifications d'ultrastructure cellulaires après exposition à du sélénium ont déjà été observées chez d'autres modèles biologiques, tels que l'algue (Morlon *et al.*, 2005), la daphnie (Schultz *et al.*, 1980) ou encore le poisson (Lemly, 2002a). A notre connaissance, aucune étude concernant l'ultrastructure du tissu branchial après exposition à du sélénium n'a été réalisée chez le bivalve. Cependant, il a été montré dans le cas du Hg, des modifications ultrastructurales au niveau des filaments branchiaux de *Perna perna*, en liaison avec des modifications d'activité ventilatoire (Gregory *et al.*, 2002).

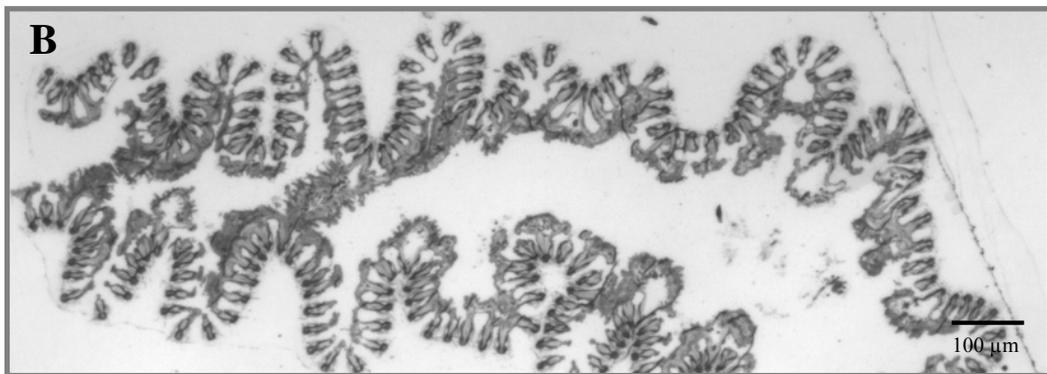
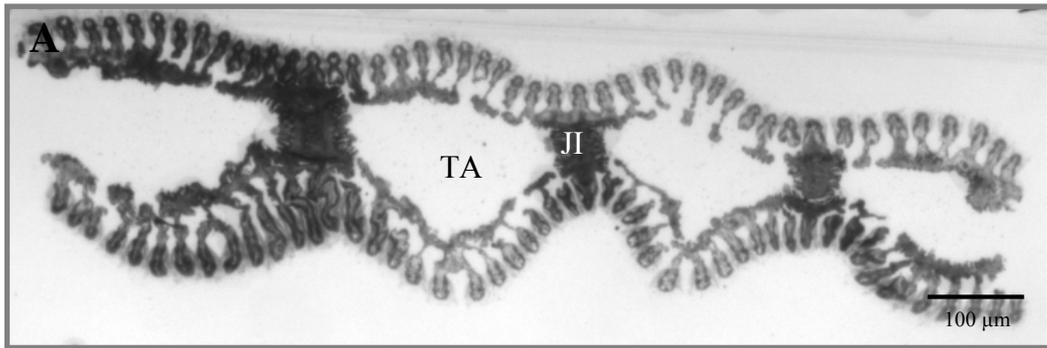


Figure 38 : Coupe transversale dans un feuillet d'hémibranchie de *C. fluminea*, observée au microscope optique. A : groupe Témoins ; B : groupe exposé à la SeMet ; C : groupe exposé au Sélénite. TA : tube aquifère ; JI : Jonction interfilamentaire.

L'effet de ces 2 formes chimiques de Se, sélénite et SeMet, sur l'ultrastructure des cellules branchiales a été déterminé à la même dose de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ après 20 jours d'exposition. Les échantillons ont été prélevés dans le cadre de l'expérience concernant la caractérisation de la bioaccumulation (§ 4.2) dont les conditions expérimentales générales ont été présentées dans la Figure 25. Pour chaque condition expérimentale (témoins, sélénite, SeMet), plusieurs coupes fines de branchies (90 nm) réalisées à partir de trois individus différents, ont été observées et analysées au microscope optique et/ou électronique à transmission. Nous ne présentons ici que des effets qui ont été observés systématiquement pour les trois réplicats. Des analyses à la sonde X ont été effectuées et n'ont pas permis de localiser le sélénium au sein du tissu branchial.

4.3.3.2. Résultats

Les jonctions interfilamentaires

Des coupes fines, transversales des filaments branchiaux sont présentées sur la Figure 38. Elles ont été observées à faible grossissement avec un microscope optique. Sur la Figure 38A, on peut observer l'aspect d'un feuillet de branchies chez le groupe témoin. Il est composé de 2 rangées de filaments réfléchis, reliés par des jonctions interfilamentaires.

Dans la Figure 38B, qui présente la même vue chez des bivalves exposés à la SeMet, nous constatons une désorganisation générale du feuillet et d'importantes ruptures des jonctions interfilamentaires. En ce qui concerne le groupe exposé au sélénite (Figure 38C), quelques jonctions sont rompues, mais l'effet le plus remarquable est que les lames semblent rétractées. Pour chaque condition, le nombre de jonctions interfilamentaires rompues ont été estimées sur les deux feuillets d'une des hémibranchies (lame) des 3 réplicats. Il n'y a que 42 % de jonctions intactes dans le cas des bivalves exposés au sélénite, 33 % dans le cas du groupe exposé à la SeMet, contre 92 % chez le groupe témoin.

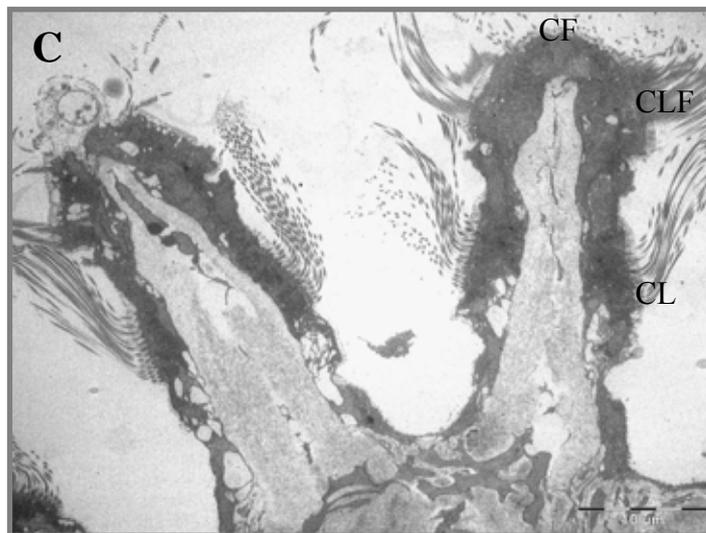
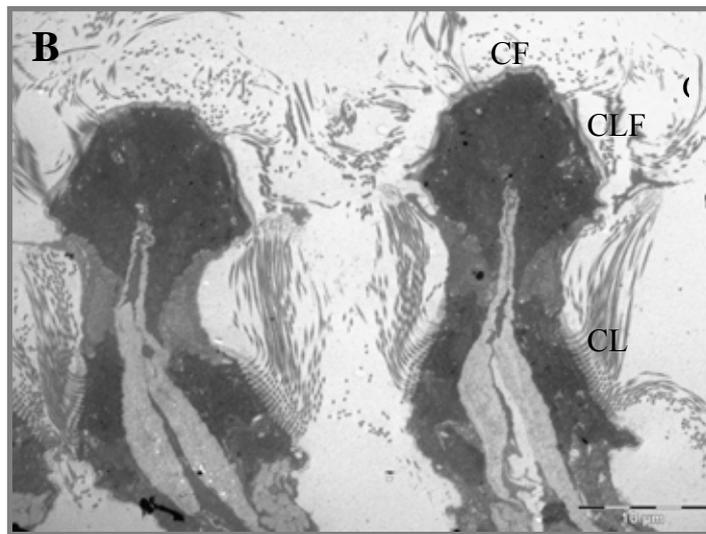
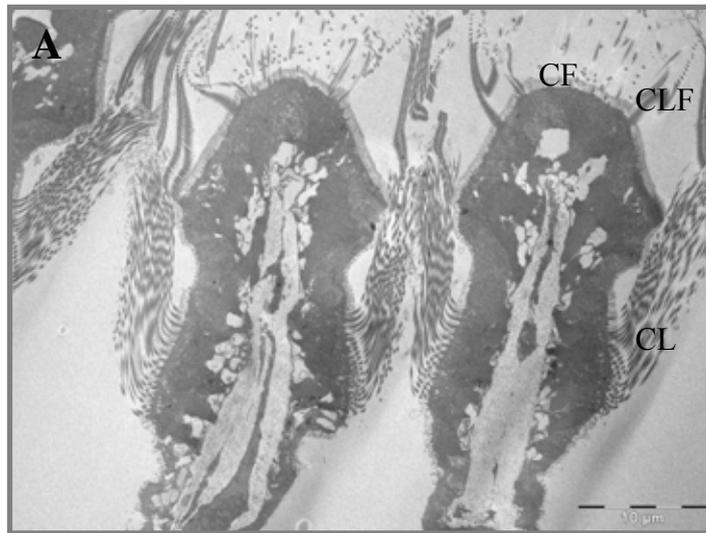


Figure 39 : Coupes fines transversales de filaments branchiaux de *C. fluminea* observées au MET. A : groupe Témoins ; B : groupe exposé à la SeMet; C : groupe exposé au Sélénite. CF : cils frontaux ; CLF : cils latéraux frontéraux ; CL : cils latéraux.

Les filaments branchiaux

Des coupes fines coupées transversalement au niveau des filaments branchiaux de *C. fluminea* ont été analysées par microscopie électronique à transmission et sont présentées sur la Figure 39. Dans la Figure 39A, nous observons une vue des filaments branchiaux chez les bivalves témoins. Chaque filament est fait de deux zones, frontale et abfrontale. La face frontale possède des cils frontaux, latérofrontaux et latéraux, et la face abfrontale possède beaucoup moins de cils.

Dans la Figure 39B, on peut observer les filaments du groupe exposé à la SeMet. La zone frontale devient très dense et la zone centrale enfle. Les filaments des bivalves exposés au sélénite (Figure 39C) sont également légèrement gonflés au niveau de la structure de soutien.

La zone frontale des filaments branchiaux

Sur la Figure 40, des coupes ultra fines de la partie frontale du filament sont présentées. On peut observer des vacuoles dans cette zone chez les bivalves du groupe témoin, alors que la structure des cellules dans la zone frontale des bivalves exposés à la SeMet est profondément modifiée et que les vacuoles ne sont plus observables (Figure 40B). Le plus surprenant est l'effet du sélénite où on observe des cellules frontales très endommagées (Figure 40C). Ceci a été observé dans chacun des 3 réplicats et sur plusieurs filaments. Ceci n'avait pas été observé ni chez le groupe témoin ni chez le groupe exposé à la SeMet.

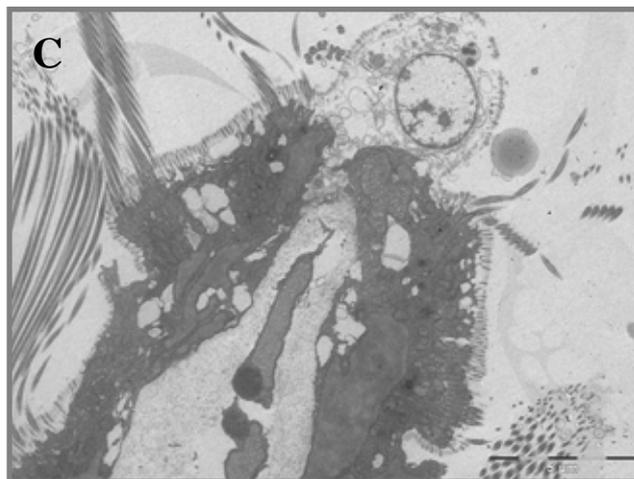
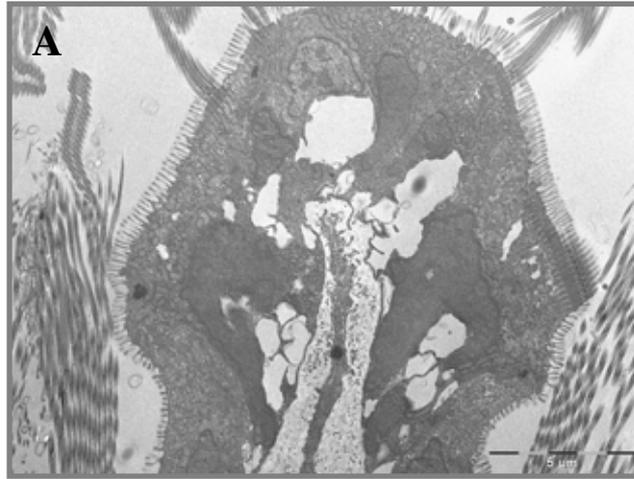


Figure 40 : Aspect de la zone frontale d'un filament branchial de *C. fluminea* au MET.
A : groupe témoin ; B : groupe exposé à la SeMet ; C : groupe exposé au Sélénite.

Mitochondries

La Figure 41 présente des photos de mitochondries observées dans les coupes transversales de filaments branchiaux. Dans la Figure 41A on observe que les mitochondries du groupe témoin ont les bords arrondis et que les crêtes sont bien dessinées. Par contre, les mitochondries du groupe exposé à la SeMet ne sont plus arrondies, voire très cabossées et l'intérieur des mitochondries semble clairement désorganisé (Figure 41B). Les mitochondries des bivalves exposés au sélénite (Figure 41C) ont la même allure que celles des bivalves du groupe témoin.

4.3.3.3. Discussion

Les résultats de cette expérimentation montrent des effets histo-pathologiques du sélénium au niveau du tissu branchial de *C. fluminea*, et à différents niveaux.

Destruction du tissu branchial et implication pour la mécanique ventilatoire

Après 20 jours de contamination à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sélénite ou SeMet, les feuillets branchiaux des bivalves sont largement déstructurés. Chez les bivalves filtreurs, les branchies ont un rôle double *via* leur activité de ventilation : assurer les échanges respiratoires et la nutrition (Jorgensen, 1990). Ces modifications structurales du tissu branchial peuvent affecter le fonctionnement des branchies et donc, la mécanique ventilatoire du bivalve, et ses processus d'homéostasie. Nous avons montré dans le premier chapitre qu'effectivement cette activité ventilatoire pouvait être modifiée par le sélénium mais différemment selon la forme. Pour une exposition à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pendant 3 jours, la SeMet diminuait la ventilation alors que le sélénite augmentait la ventilation dès 1 jour d'exposition. Il a été montré que l'accumulation du mercure dans le corps mou de la moule *Perna perna*, ainsi que son taux de filtration et la morphologie de ses filaments branchiaux étaient corrélés durant la phase d'exposition à ce métal et la phase de dépuration (Gregory *et al.*, 2002).

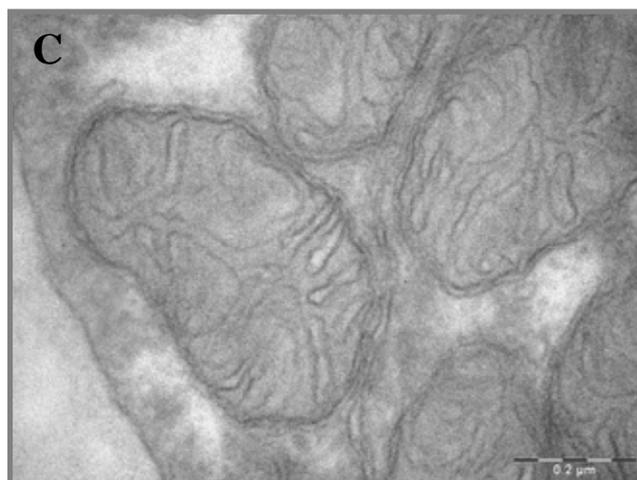
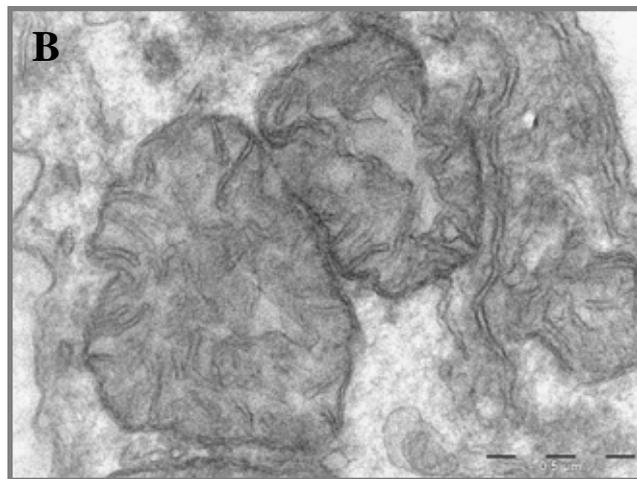
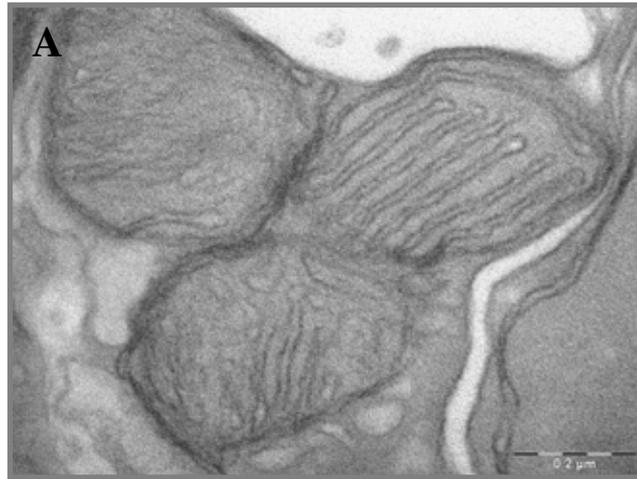


Figure 41 : Aspect des mitochondries présentes dans les cellules de filaments branchiaux de C. fluminea. A : groupe témoin ; B : groupe exposé à la SeMet ; C : groupe exposé au sélénite.

Chez ce bivalve, le premier déclin du taux de filtration dû au mercure, coïncide avec l'apparition d'une détérioration des cellules épithéliales. Il serait donc intéressant d'étudier en parallèle les cinétiques d'apparition des modifications ultrastructurales et l'impact au niveau du débit ventilatoire du sélénium chez *C. fluminea*.

Lemly (2002) a également observé des effets pathologiques au niveau des branchies d'un poisson téléostéen (*Lepomis cyanellus*) exposé à une contamination au sélénium dans le lac Belews. Des sinus dilatés et des lamelles enflées ont été observés. Cette dilatation des lamelles branchiales due au sélénium, posait des problèmes de flux sanguin, d'échanges gazeux inefficaces et une réponse métabolique accrue (augmentation de la demande respiratoire et de la consommation d'oxygène). Des effets tératogènes sur les poissons ont aussi été observés dans ce lac.

Mécanismes de toxicité

Dans nos conditions, les effets pathologiques subcellulaires observés chez *C. fluminea* exposé à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sélénite ou de SeMet pendant 20 jours sont différents.

L'exposition au sélénite désorganise les feuilletts branchiaux et induit la destruction des cellules frontales des filaments. L'exposition à la SeMet désorganise les feuilletts branchiaux et induit une modification de l'ultrastructure des mitochondries. Nous avons vu précédemment que lors de cette expérimentation, la répartition subcellulaire du sélénium avait été modifiée après exposition de 20 jours à la SeMet (§ 4.2), avec une augmentation de la part de Se dans la fraction incluant les mitochondries. Cette incorporation de la SeMet peut être responsable de la modification ultrastructurale observée au niveau de cet organite. L'hypothèse d'une peroxydation lipidique au niveau des membranes mitochondriales peut être avancée.

Peu d'études ont été menées concernant les effets du sélénium au niveau de l'ultrastructure des cellules. Schultz *et al.* (1980) ont observé des dommages ultrastructuraux chez la daphnie dès 16 h d'exposition à $2 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de sélénite. Dans tous les tissus qu'ils ont observés (muscles, nerf), les premiers organites touchés étaient les mitochondries. Elles commençaient par gonfler et semblaient se désorganiser. Le gonflement était suivi par l'apparition de granules denses dans la matrice mitochondriale. Les mitochondries pouvaient finir par dégénérer avec le temps. Les mitochondries semblent donc être un organite cible pour le sélénium.

Morlon *et al.* (2005) ont montré que le sélénite pouvait engendrer des dommages ultrastructuraux chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* après une exposition à 50 μM (4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Les effets étaient visibles au niveau du chloroplaste, caractérisé par un stroma granuleux et moins dense, des thylakoïdes qui se déformaient et prenaient l'allure d'empreintes et du pyrénoloïde qui se désagrègeait. Aux concentrations plus élevées (500 μM , soit 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) une importante production d'amidon était observée.

D'autres effets cellulaires ont été montrés en présence de Se. Il a également été montré que le sélénite de sodium pouvait altérer le potentiel de membrane de la mitochondrie et donc contribuer à l'apoptose (Kim *et al.*, 2002) dans les cellules de foie de rat. Ces auteurs suggèrent que l'oxydation des groupements thiols par le sélénite (formant des sélénotrisulfure S-Se-S par exemple), engendrerait une chute du potentiel de membrane mitochondriale qui entraînerait un relargage de cytochrome c, induisant l'apoptose. L'effet anticancer du sélénium serait dû à ce phénomène. De même, Stewart *et al.* (1999) montrent chez la souris, l'induction par le sélénite d'un stress oxydant et l'apoptose des kératinocytes.

En conclusion, l'exposition de 20 jours à 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sélénite a induit la destruction des cellules frontales des filaments branchiaux de *C. fluminea*. Ceci peut être dû à un stress oxydant suite à l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène. Peu d'études ont été menées quant à la toxicité de la SeMet. Palace *et al.* (2004) montrent qu'après métabolisation, la SeMet pourrait générer un ion superoxyde chez l'embryon de truite, ce qui induirait un stress oxydant. Dans nos conditions, les effets observés sont localisés au niveau des feuillets branchiaux et des mitochondries. Cet effet de la SeMet au niveau des mitochondries peut être lié à l'oxydation d'un thiol au niveau de la membrane mitochondriale. Des pontages de type triséniure (Se-Se-Se) ou sélénotrisulfure (S-Se-S) pourraient se faire à ce niveau, ce qui expliquerait d'une part l'augmentation de Se dans cet organe (§ 4.2) et la modifications de l'ultrastructure des membranes mitochondriales.

4.3.3.4. Principales avancées et conclusions

Nous avons montré dans ce chapitre que le sélénium était capable d'induire des modifications ultrastructurales au niveau des cellules branchiales de *C. fluminea*. Ces modifications peuvent aboutir à un mauvais fonctionnement des branchies et ainsi perturber l'homéostasie de l'oxygène chez le bivalve. Les conséquences peuvent être fatales pour cet organisme car les branchies assurent respiration et nutrition.

4.3.4. Principales avancées et conclusions du chapitre

En conclusion, les différentes formes de sélénium aux concentrations étudiées entraînent de faibles perturbations de la balance pro-/antioxydante chez *C. fluminea*. Les principaux effets sont observés précocement après exposition à la SeMet, les biomarqueurs affectés étant les activités SOD, GPx et du taux de GSH_{total}.

Des modifications de l'expression de certains gènes ont également été observées après exposition au Se. Notamment, la répression de l'expression de *mt1* suite à l'exposition à la SeMet est observée. De plus, l'expression du gène *tit*, codant pour la titine, protéine impliquée dans le fonctionnement musculaire est significativement différente entre les bivalves exposés au sélénite et à la SeMet, ce qui peut être mis en relation avec l'effet au niveau ventilatoire. Une surexpression de *rpS9* après exposition au sélénite pourrait être le signe d'une mise en place de système de protection face à la toxicité de cette forme.

Enfin, nous avons montré dans ce chapitre que le sélénium était capable d'induire de profondes modifications ultrastructurales au niveau des cellules branchiales de *C. fluminea*. Les effets observés étaient drastiquement différents entre les bivalves exposés au sélénite et ceux exposés à la SeMet.

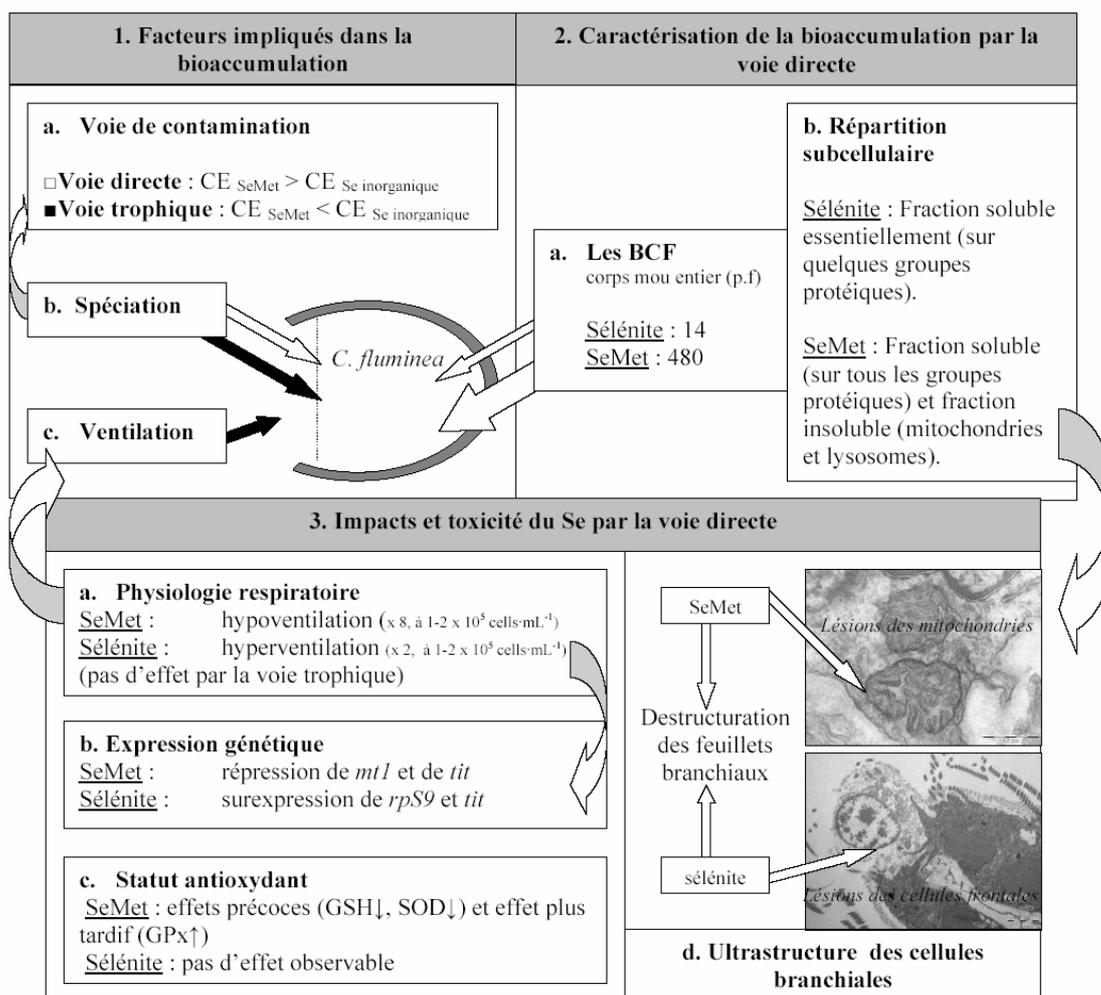


Figure 42 : Représentation schématique des principaux résultats obtenus.

1. Facteurs impliqués dans la bioaccumulation, a. la voie de contamination, en blanc la voie directe, en noir la voie trophique ; b. la spéciation, qui conditionne la prise en charge du sélénium (CE : coefficient d'extraction), par la voie directe la SeMet est la forme la mieux extraite, par la voie trophique, le sélénium est mieux extrait lorsque la nourriture est contaminée avec les formes inorganiques. c. la ventilation du bivalve modifie les influx de Se et la bioaccumulation par la voie trophique, 2. Caractérisation de la bioaccumulation par la voie directe, a. $BCF_{SeMet} = 480$ et $BCF_{Sélénite} = 14$, b. répartitions subcellulaires du sélénium différentes selon les formes apportées. 3. toxicité du sélénium par la voie directe, a. impacts du sélénite et de la SeMet sur la ventilation, b. modifications de l'expression de certains gènes, dont celui de la titine en liaison avec les modifications de ventilation, c. modifications de la balance pro-/antioxydante après exposition à la SeMet, d. effet sur l'ultrastructure des cellules branchiales, et notamment modification de ultrastructure des mitochondries en liaison avec une accumulation de Se dans ces organites après exposition à la SeMet.

5. CONCLUSION GENERALE

5.1. Synthèse des principales avancées

L'objectif de notre étude était de mieux comprendre les processus de bioaccumulation et de toxicité du sélénium chez un modèle biologique bivalve, *Corbicula fluminea*. L'impact des principaux facteurs physiologiques et environnementaux pouvant intervenir dans ces processus : quantité de nourriture disponible, activité ventilatoire du bivalve, spéciation chimique du sélénium et voie de contamination, a été analysé. L'un des points forts de notre démarche a été de réaliser toutes les expériences dans des conditions expérimentales contrôlées, incluant l'analyse des stratégies adaptatives de l'animal face aux variations de la composition du milieu, afin d'approfondir l'interprétation des résultats. L'ensemble des résultats sont représentés schématiquement dans la Figure 42.

5.1.1. Avancées concernant l'écophysiologie du bivalve

Avancées en écophysiologie de la nutrition chez le bivalve

Nous avons confirmé l'existence d'un mécanisme de régulation de l'apport trophique par la ventilation en fonction de la concentration de phytoplancton dans l'eau. D'une façon générale, en dessous d'une valeur critique, la ventilation augmente quand la concentration de plancton diminue. Au-dessus de cette valeur, elle se stabilise à un niveau constant. Cette régulation se réalise entre 1 et 10×10^5 cells·mL⁻¹ de *Chlamydomonas reinhardtii* à 20 °C ce qui équivaut à des milieux mésotrophes à très eutrophes. Ces résultats confirment et complètent ceux de Tran *et al.* (2002), qui avaient montré un ajustement de la ventilation de *C. fluminea* en fonction de l'apport trophique en *Scenedesmus subspicatus*. Le débit ventilatoire de référence chez nos organismes, nourris avec *C. reinhardtii*, est légèrement plus élevé que celui observé par Tran *et al.* (2002) avec *S. subspicatus* (d'un facteur 2 à 3), ce qui pourrait suggérer l'adaptation des bivalves face à la qualité nutritive des algues.

L'écophysiologie en tant qu'outil en écotoxicologie

Les réponses valvaires ou ventilatoires des bivalves sont généralement considérées comme de bons marqueurs précoces de contamination. Cependant, la toxicité de polluants dépend largement de leur spéciation et cet aspect est généralement négligé dans ces études basées sur l'écophysiologie. L'originalité de notre étude a été d'étudier l'impact de trois formes différentes de sélénium sur la ventilation du bivalve. De plus, les effets toxiques potentiellement induits par ces formes de Se ont été analysés à différentes échelles, de l'animal entier à la cellule, en explorant quelques réponses au niveau du génome, dans les mêmes conditions afin de mieux comprendre quelques unes des potentialités toxiques du sélénium. Nos résultats montrent que les effets du sélénium sur la ventilation existent, et qu'ils sont largement dépendants des formes chimiques étudiées. Le sélénite stimule la ventilation du bivalve, et la SeMet peut la diminuer, en contrebalançant la stimulation ventilatoire induit par une baisse de concentration de plancton. Des études complémentaires ont confirmé que des effets toxiques pouvaient être observés après exposition à ces formes de Se. En ce qui concerne le séléniate aucune modification du débit ventilatoire n'a été observée. Des effets précoces du séléniate sur le statut antioxydant sont possibles mais les données sont insuffisantes pour statuer sur la toxicité de cette forme. Avec l'exemple du sélénite et de la SeMet, la modification du comportement ventilatoire de *C. fluminea* semble donc être un premier indicateur de toxicité dans le sens où il nous informe sur la façon dont le contaminant est perçu par l'animal intact. Cependant, le nombre important de facteurs environnementaux pouvant modifier la physiologie du bivalve dans des biotopes où la qualité de l'eau est très variable rend difficile son utilisation sur le terrain par des non-spécialistes et sans étude préalable visant à comprendre et quantifier l'influence des différents paramètres environnementaux. En revanche, une utilisation standardisée en laboratoire des mesures de débit ventilatoire ou d'indices d'activité valvaire pourrait être un bon outil d'écotoxicologie.

5.1.2. Avancées concernant la bioaccumulation du sélénium

Avancées concernant les facteurs impliqués dans la bioaccumulation du sélénium

L'originalité de nos recherches concernant les processus de bioaccumulation du sélénium chez *C. fluminea*, a été d'intégrer dans une même étude globale, les différents facteurs susceptibles d'influencer la bioaccumulation : la spéciation chimique du sélénium, la physiologie du bivalve et la voie de transfert. Les expériences réalisées ont permis d'aboutir à différentes conclusions :

- La spéciation chimique du sélénium conditionne largement sa bioaccumulation. Les formes inorganiques de sélénium (sélénite et séléniate) sont très peu biodisponibles pour *C. fluminea* par la voie directe. En revanche, la forme organique, SeMet, bien que présente à très faible concentration sur le terrain, montre une large biodisponibilité pour *C. fluminea*.
- Aux concentrations (certainement élevées) et durées d'exposition testées, la ventilation du bivalve n'est pas un facteur limitant pour la bioaccumulation du sélénium par la voie directe, c'est-à-dire du sélénium dissous. En revanche, son importance est soulignée lors du transfert trophique du sélénium. La prise en compte de l'impact du sélénium dissous sur la ventilation est cependant indispensable, car en conditions naturelles les deux voies de contamination sont présentes simultanément. Une augmentation de la ventilation due au sélénite dissous (forme majoritaire en eau douce) pourrait augmenter la quantité d'algues ingérées et donc la quantité de Se accumulée par la voie trophique.
- La voie trophique est la voie de transfert la plus efficace (en termes d'extraction) pour les formes inorganiques de Se, tandis que la voie directe est la voie de transfert la plus efficace pour la SeMet.

Avancées concernant le transfert trophique du sélénium

L'algue verte unicellulaire *C. reinhardtii* a été utilisée comme support nutritif pour le bivalve et vecteur de Se. Dans la littérature, le transfert trophique du sélénium entre algue et bivalve a essentiellement été étudié sur la base d'une contamination initiale en sélénite. L'originalité de notre étude a été d'analyser le transfert trophique à partir de trois formes chimiques différentes dans la source de contamination. Ainsi, la bioaccumulation de ces formes chez l'algue a été caractérisée. Nos résultats suggèrent des mécanismes de transport et des biodisponibilités différents entre les 3 formes. Une plus grande biodisponibilité de la SeMet par rapport aux formes inorganiques a été observée chez l'algue. Les conséquences pour le transfert trophique existent et nos résultats suggèrent des efficacités d'extraction du sélénium par le bivalve variables en fonction de la forme initiale en Se.

Avancées concernant la bioaccumulation du sélénium chez C. fluminea à différents niveaux d'organisation biologique

Une des originalités de notre étude a été d'étudier la bioaccumulation et la dépuración du sélénium, sous 2 formes, à différents niveaux d'organisation biologique allant de l'organisme entier jusqu'au niveau moléculaire. Il a été montré chez *C. fluminea* des mécanismes d'accumulation et de dépuración différents selon la forme de sélénium considérée. La forme SeMet est très vite internalisée et à des taux élevés, tandis que la prise en charge du sélénite est moindre et plus lente. Nous avons montré dans le cas de l'exposition à la SeMet, que 40 % du sélénium était toujours présents dans l'organisme après 50 jours de dépuración, alors que dans le cas d'une exposition au sélénite, le sélénium accumulé était totalement éliminé. Une exposition à partir de SeMet conduit donc à des contaminations en Se plus durables chez *C. fluminea* que celles engendrées par une exposition à partir de sélénite. De plus, nous avons observé des répartitions subcellulaires différentes selon les formes de sélénium étudiées. Apporté sous forme de SeMet, le sélénium internalisé se retrouvait aussi bien dans la fraction soluble que dans la fraction insoluble dès 1 jour de contamination, alors qu'apporté sous forme de sélénite, il était principalement accumulé dans le cytosol. Il a également été mis en évidence que le sélénium pouvait se fixer sur de nombreuses protéines cytosoliques, notamment lorsqu'il était apporté sous forme de SeMet.

L'étude de la répartition du sélénium apporté sous forme de SeMet au sein de la fraction insoluble a montré une augmentation de la part de sélénium dans la fraction incluant les mitochondries et les lysosomes, après 20 jours de contamination. Parallèlement, lors de la même expérience, une modification de l'ultrastructure des mitochondries a été observée. Cette répartition subcellulaire différente pourrait bien être associée à des mécanismes de toxicité différents, qu'il sera intéressant d'explorer.

5.1.3. Avancées concernant la toxicité du sélénium

Les effets qui ont été observés sur la ventilation dans le cas de l'exposition à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de SeMet ou de sélénite nous ont conduit à étudier les potentialités toxiques de ces formes à ces doses. L'originalité de ce travail a été d'étudier la toxicité de ces formes à des niveaux variés (statut antioxydant, expression de gènes, ultrastructure du tissu branchial). Nous avons observé des réponses biochimiques et génétiques face à ces formes d'amplitude faible.

Les caractéristiques d'un stress oxydant d'amplitude faible étaient associées à la SeMet, tandis que l'expression de certains gènes est apparue amplifiée après exposition au sélénite, notamment celui de la titine (*tit*), protéine impliquée dans le fonctionnement musculaire et celui de la protéine ribosomique S9 (*rpS9*) dont l'augmentation d'expression suggère fortement la mise en place de mécanismes de réparation de l'ADN.

Les effets les plus marqués du sélénite et de la SeMet se sont manifestés au niveau de l'ultrastructure des cellules branchiales qui a été largement modifiée. D'une manière générale, le tissu branchial est apparu désorganisé, avec une atteinte profonde des mitochondries dans le cas de l'exposition à la SeMet et une atteinte des filaments branchiaux dans le cas de l'exposition au sélénite. Rappelons que la présence et la potentialité toxique du métalloïde sous forme dissoute a été détectée précocement par le bivalve, puisqu'il avait modifié son comportement ventilatoire dès le premier jour de contamination à ces formes de Se.

Il semblerait que la concentration testée, $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, soit très toxique pour *C. fluminea*. Le fait que le tissu branchial de *C. fluminea* soit totalement désorganisé après 20 jours d'exposition au sélénium, peut expliquer la faible intensité des réponses observées au niveau moléculaire. Les perturbations seraient trop avancées en liaison avec une concentration et une durée d'exposition trop élevées induisant le dépassement des réponses à des niveaux d'organisation biologique inférieurs.

5.2. Perspectives de recherches

L'ensemble des résultats acquis lors des différentes expériences menées dans ce travail de thèse, conduit à de nombreuses perspectives de recherche.

5.2.1. Concernant l'écophysiologie de *C. fluminea*

*Etudier des modifications de la ventilation de *C. fluminea* à faibles concentrations en sélénium*

Nous avons mis en évidence que *C. fluminea* modifiait son comportement ventilatoire très précocement après exposition à $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sélénite ou de SeMet. Dans les écosystèmes naturels, les concentrations en Se sont généralement inférieures au $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Cependant, en France, la concentration maximale admissible pour les eaux de surface, $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, est régulièrement dépassée (AFSSA, 1999; AFSSA, 2004). Il serait intéressant d'étudier les réponses ventilatoires à de plus faibles concentrations ambiantes en Se, afin de déterminer la concentration minimale détectée par *C. fluminea*. Des études, utilisant les techniques récemment re-développées de la valvométrie, et semblables à celles déjà réalisées pour le cadmium (seuil minimal détectable, $16 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.14 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ à pH 7.9 ± 0.1 ; Tran *et al.*, 2003), le cuivre ($4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ à pH 8.2 ± 0.1 ; Tran *et al.*, 2004), l'uranium (U total, $19 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.08 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ à pH 5.5 ± 0.1 ; Fournier *et al.*, 2004) et le mercure ($3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.015 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ à pH 8.2 ± 0.1 ; Tran, en préparation) devraient être envisagées.

Etudier le lien entre modification de la ventilation et modification de l'ultrastructure des cellules branchiales

Nous avons mis en évidence, que la concentration de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, qui avait causé des modifications ventilatoires après 1, 2 et 3 jours d'exposition au sélénite ou à la SeMet, engendre une toxicité pour les cellules branchiales de *C. fluminea* après 20 jours d'exposition. Il sera fondamental d'étudier en parallèle les cinétiques de modifications de la ventilation et de l'ultrastructure des cellules branchiales, à de plus faibles doses mais aussi sur du plus long terme.

5.2.2. Concernant la bioaccumulation

Etudier la répartition subcellulaire du sélénium dans l'algue et sa spéciation chimique

Les études concernant le transfert trophique du sélénium entre *C. reinhardtii* et *C. fluminea* ont montré que la bioaccumulation du sélénium chez le bivalve dépendait largement des formes utilisées pour la pré-exposition des algues. Une relation entre la part de Se dans la fraction cytosolique des algues ingérées et la bioaccumulation du sélénium chez le bivalve a été montrée chez plusieurs espèces de bivalves. Il serait donc intéressant d'étudier la répartition subcellulaire des différentes formes de Se au sein de l'algue. De plus, l'étude conjointe de la spéciation chimique du sélénium internalisé permettrait de mieux comprendre quelles sont les espèces chimiques impliquées dans le transfert trophique du sélénium.

Etudier la spéciation chimique du sélénium chez C. fluminea

Nous avons observé des répartitions subcellulaires du sélénium dans les branchies et la masse viscérale du bivalve qui sont différentes lorsque la forme apportée est le sélénite ou la SeMet. Nous avons aussi montré que le sélénium internalisé après exposition à la SeMet pouvait se fixer sur un grand nombre de protéines. Il serait intéressant de caractériser ces protéines et de définir la spéciation chimique du sélénium dans l'organisme afin de mieux comprendre les mécanismes de toxicité des différentes formes et de détoxification (notamment par les formes méthylées).

Etudier l'efficacité d'assimilation des différentes formes de sélénium

Nous avons étudié la capacité de *C. fluminea* à extraire les différentes formes de Se à partir des quantités ventilées. Le transfert trophique du sélénium pourrait être analysé plus finement, sur du court terme, en mesurant l'efficacité d'assimilation des différentes formes. Ceci pourrait être réalisé par des techniques non destructrices, par comptage γ , après marquage radioactif des différentes formes de Se. De plus, la compréhension des processus impliqués dans le transfert trophique du sélénium, pourrait être améliorée par une meilleure connaissance des mécanismes de digestion chez *C. fluminea* (la connaissance du temps d'évacuation du tube digestif serait à mesurer par exemple).

5.2.3. Concernant la toxicité

Etudier la toxicité par la voie trophique

Aux doses étudiées, nous avons mis en évidence une toxicité du sélénium par la voie directe, Se dissous dans l'eau, et notamment lorsque le sélénium était apporté sous forme de SeMet. Or cette forme est considérée comme majoritaire dans les algues et tissus végétaux en général. La toxicité de cette forme peut laisser présager une toxicité du sélénium par la voie trophique chez le bivalve filtreur. Ainsi, il serait intéressant de compléter ces études par l'analyse de la toxicité du sélénium par la voie trophique.

Etudier la toxicité à d'autres niveaux que les niveaux individuels ou subindividuels

La toxicité du sélénium a été étudiée au niveau individuel ou subindividuel. Afin de mieux appréhender les conséquences pour l'écosystème, la toxicité du sélénium pourrait être appréhendée au niveau de la population, en étudiant les effets du sélénium sur la reproduction. L'utilisation d'un autre modèle biologique, dont l'élevage en laboratoire et la connaissance du cycle de vie seraient maîtrisés pourrait être envisagée.

Etudier les mécanismes de toxicité

Nous avons vu que la SeMet pouvait entraîner une modification de l'ultrastructure des mitochondries présentes dans les cellules de filaments branchiaux. Des mesures d'activités enzymatiques et/ou d'expression génétique des enzymes antioxydantes ainsi que des mesures de peroxydation lipidique pourraient être réalisées, au niveau du tissu branchial, afin de mieux comprendre les mécanismes responsables de ce phénomène. De même des études génotoxiques pourraient être envisagées.

Etudier l'essentialité versus toxicité du sélénium

La dose testée de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a induit une profonde toxicité pour *C. fluminea*. Il serait intéressant de tester des doses plus faibles afin de pouvoir distinguer les zones d'essentialité et de toxicité du sélénium chez cet organisme. De plus, il serait intéressant de tester l'effet protecteur ou non du sélénium en contexte de multipollution.

Références bibliographiques

- 2000/60/CE Directive 2000/60/CE du parlement européen et du conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau. *Journal officiel des communautés européennes* **L327**: 1-72.
- Achard-Joris, M., Gonsalez, P., Marie, V., Baudrimont, M. and Bourdineaud, J. P. (2005). cDNA cloning and gene expression of ribosomal S9 protein in the mollusc *Corbicula fluminea*: a new potential biomarker of metal contamination up-regulated by cadmium and repressed by zinc. *Environ Toxicol Chem* (**accepted**).
- AFSSA (1999). Rapport d'activité pour l'année 1999: 19.
- AFSSA (2004). Evaluation des risques sanitaires liés aux situations de dépassement des limites de référence de qualité des eaux destinées à la consommation humaine.: 72.
- Aldridge, D. and Muller, S. (2001). The asiatic clam, *Corbicula fluminea*, in britain: current status and potential impacts. *journal of conchology* **37**: 177-183.
- ANDRA (2001). Dossier 2001 – référentiel Biosphère.: 243.
- Andrés, S., Baudrimont, M., Ribeyre, F., Boudou, A., Lapaquellerie, Y., Maillet, N. and Latouche, C. (1999). Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (River Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**(11): 2462-2471.
- Arteel, G. and Sies, H. (2001). The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **10**: 153-158.
- Barceloux, D. (1999). Selenium. *Clinical Toxicology* **37**(2): 145-172.
- Bennett, W. (1988). Assessment of selenium toxicity in algae using turbidostat culture. *Water reseach* **22**: 939-942.
- Bertram, P. E. and Brooks, A. S. (1986). Kinetics of accumulation of selenium from food and water by fathead minnows. *Water Research* **20**: 877-884.
- Besser, J. M., Canfield, T. J. and La Point, T. W. (1993). Bioaccumulation of organic and inorganic selenium in a laboratory food chain. *Environmental Toxicology and Chemistry* **12**(1): 57-72.
- Bokovay, G. (1995). Sélénium et Tellure. *Métaux non ferreux spécialisés*: 40.29-40.32.
- Bonneris, E., Giguere, A., Perceval, O., Buronfosse, T., Masson, S., Hare, L. and Campbell, P. G. (2005). Sub-cellular partitioning of metals (Cd, Cu, Zn) in the gills of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*: role of calcium concretions in metal sequestration. *Aquat Toxicol* **71**(4): 319-34.
- Britton, J. C. and Morton, B. (1982). A dissection guide, field and laboratory manual for the introduced bivalve *Corbicula fluminea*. *Malacological review*: 10.
- Camilleri, V., Simon, O. and Grasset, G. (2004). "Subcellular fraction associated to radionuclide analysis in various tissues: Validation of the technique by using light and electron observations applied on bivalves and uranium." ECORAD, Aix-en-Provence.
- Chen, C., Zhao, J., Zhang, P. and Chai, Z. (2002). Speciation and subcellular location of selenium-containing proteins in human liver studied by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and hydride generation-atomic fluorescence spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem* **372**(3): 426-30.
- Clairborne, A. (1985). Catalase activity. *In Handbook of methods for oxygen radical research*. Greewald R.A. Ed., Boca Raton, CRC Press,: 283-284.

- Cleveland, L., Little, E. E., Buckler, D. R. and Wiedmeyer, H. (1993). Toxicity and bioaccumulation of waterborne and dietary selenium in juvenile bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Aquatic Toxicology* **27**(3-4): 265-280.
- Cometti, G. (2003). Les limites du stretching pour la performance sportive. 2ème partie: "Les effets physiologiques des étirements". <http://www.u-bourgogne.fr/EXPERTISE-PERFORMANCE/Les%20limites%20du%20stretching%20%202003oct.pdf>.
- Conde, J. E. and Sanz Alaejos, M. (1997). Selenium Concentrations in Natural and Environmental Waters. *Chem Rev.* **97**: 1979-2004.
- Coughlan, J. (1969). The estimation of filtering rate from clearance of suspensions. *Mar Biol* **2**: 356-358.
- Coughtrey, P. J., Jackson, D. and Thorne, M. C. (1983). Selenium. in "Radionuclide distribution and transport in terrestrial and aquatic ecosystems." A. Balkema. Rotterdam. **vol III** :.
- Cutter, G. A. and Cutter, L. S. (2004). Selenium biogeochemistry in the San Francisco Bay estuary: changes in water column behavior. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **61**(3): 463-476.
- Delbart, C. (2000). Les mitochondries: biologie et incidences physiopathologiques. *Editions TEC & DOC*.
- Dietz, T. H. and Byrne, R. A. (1999). Measurement of sulfate uptake and loss in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* using a semi-microassay. *Canadian Journal of Zoology* **77**(2): 331-336.
- Dillon, R. T. (2000). The ecology of freshwater molluscs. *Press syndicate of the university of Cambridge, Cambridges, United Kingdom*.
- Dobbs, M. G., Cherry, D. S. and Cairns Jr., J. (1996). Toxicity and bioaccumulation of selenium to a three-trophic level food chain. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(3): 340-347.
- Dragun, Z., Erk, M., Raspor, B., Ivankovic, D. and Pavicic, J. (2004). Metal and metallothionein level in the heat-treated cytosol of gills of transplanted mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Environ Int* **30**(8): 1019-25.
- Ducros, V. and Favier, A. (2004). Selenium metabolism. *EMC-endocrinologie* **1**: 19-28.
- EPA (2004). Aquatic Life Water Quality Criteria for Selenium, EPA.
- Eustice, D., Fredrick, J. and A, S. (1981). Selenium toxicity: Aminoacylation and peptide bond formation with selenomethionine. *Plant. Physiol.* **67**: 1054-1058.
- Fan, T. W., Teh, S. J., Hinton, D. E. and Higashi, R. M. (2002). Selenium biotransformations into proteinaceous forms by foodweb organisms of selenium-laden drainage waters in California. *Aquat Toxicol* **57**(1-2): 65-84.
- Foe, C. and Knight, A. (1986). Growth of *Corbicula fluminea* (bivalvia) fed artificial and algal diets. *Hydrobiologia* **133**: 155-164.
- Fournier, E., Tran D, Denison F, JC, M. and J., G.-L. (2004). Valve closure response to uranium exposure for a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*): Quantification of the influence of pH. *Aquatic Toxicology* **23**: 1108-1114.
- Fowler, S. W. and Benayoun, G. (1976). Accumulation and distribution of selenium in mussel and shrimp tissues. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **16**(3): 339-346.
- Gainey, L. F., Walton, J. C. and Greenberg, M. J. (2003). Branchial musculature of a Venerid Clam: Pharmacology, Distribution, and Innervation. *Biol bull* **204**: 81-95.
- Ganther, H. E. (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* **20**(9): 1657-66.
- Garbisu, C., T, I., T, L. and BB, B. (1996). Bacterial reduction of selenite to elemental selenium. *Chemical Geology* **132**: 199-204.

- Gardiner, D. B., Silverman, H. and Dietz, T. H. (1991). Musculature Associated with the water canals in freshwater mussels and response to monoamines in vitro. *Biol Bull* **180**: 453-465.
- Garnier-Laplace, J., Vray, F. and Baudin, J. P. (1997). Dynamic model for radionuclide transfer from water to freshwater fish. Estimation of accumulation and depuration kinetic parameters for ¹³⁷Cs and ¹⁰⁶Ru in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Water Air Soil Pollution* **98**: 141-166.
- George, W. G. (2003). Selenium and tellurium. 65.1-65.5.
- Giguere, A., Couillard, Y., Campbell, P. G., Perceval, O., Hare, L., Pinel-Alloul, B. and Pellerin, J. (2003). Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquat Toxicol* **64**(2): 185-200.
- Goldhaber, S. B. (2003). Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **38**(2): 232-242.
- Greenwald, R. A. (1985). "Handbook of Methods for Oxygen Radical Research". Boca Raton, CRS Press.
- Gregory, M. A., Marshall, D. J., George, R. C., Anandraj, A. and McClurg, T. P. (2002). Correlations between metal uptake in the soft tissue of *Perna perna* and gill filament pathology after exposure to mercury. *Marine Pollution Bulletin* **45**(1-12): 114-125.
- Gunther, A. J., Hardin, D. D., Gold, J., Bell, D., Davis, J. A., Crick, J. R., Scelfo, G. M., Sericano, J. and Stephenson, M. (1999). Long-term bioaccumulation monitoring with transplanted bivalves in the San Francisco Estuary. *Marine Pollution Bulletin* **38**(3): 170-181.
- Guo, X. and Wu, L. (1998). Distribution of Free Seleno-amino Acids in Plant Tissue of *Melilotus indica* L. Grown in Selenium-Laden Soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **39**: 207-214.
- Hamilton, S. J. (2004). Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Sci Total Environ* **326**(1-3): 1-31.
- Harris, E. (1988). *The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use.*: Academic Press, Inc., San Diego.
- Hawkes, W. C., Wilhelmsen, E. C. and Tappel, A. L. (1985). Abundance and tissue distribution of selenocysteine-containing proteins in the rat. *Journal of Inorganic Biochemistry* **23**(2): 77-92.
- Himeno, S. and Imura, N. (2000). New aspects of physiological and pharmacological roles of selenium. *Journal of Health science* **46**(6): 393-398.
- Hodson, P. V. and Hilton, J. W. (1983). The nutritional requirements and toxicity to fish of dietary and waterborne selenium. *Ecol Bull* **35**: 335-340.
- Hu, M. H., Yang, Y. P., Martin, J. M., Yin, K. and Harrison, P. J. (1996). Preferential uptake of Se(IV) over Se(VI) and the production of dissolved organic Se by marine phytoplankton. *Marine Environmental Research* **44**(2): 225-231.
- Hyne, R. V., Hogan, A. C., Pablo, F. and Roach, A. C. (2002). Toxicity of Selenomethionine- and Seleno-contaminated sediment to the amphipod *Corophium* sp. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **52**: 30-37.
- INRS (2002). Sélénium et composés. Fiche toxicologique, INRS.
- Johansson, L., Gafvelin, G. and Arner, E. S. J. (2005). Selenocysteine in proteins properties and biotechnological use. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **In Press, Corrected Proof**.
- Johns, C., Luoma, S. N. and Elrod, V. (1988). Selenium Accumulation on Benthic Bivalves and Fine Sediments of San Francisco Bay, the Sacramento-San Joaquin Delta, and Selected Tributaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **27**: 381-396.

- Jorgensen, B. C. (1990). "Bivalve filter feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology." Fredensborg.
- Kessi, j., Ramuz, M., Wehrli, E., Spycher, M. and Bachofen, R. (1999). Reduction of selenite and Detoxification of Elemental selenium by the Phototrophic Bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4734-4740.
- Kiffney, P. and Knight, A. (1990). The toxicity and Bioaccumulation of selenate, Selenite and, Seleno-L-Methionine in the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*. *Archives of Environmental Toxicology* **19**: 488-494.
- Kim, S. Y., Lee, M.-Y., Cho, K. C., Choi, Y.-S., Choi, J.-S., Sung, K.-W., Kwon, O.-J., Kim, H.-S., Kim, I.-K. and Jeong, S.-W. (2003). Alterations in mRNA expression of ribosomal protein S9 in hydrogen peroxide-treated neurotumor cells and in rat hippocampus after transient ischemia. *Neurochemical Research* **28**(6): 925-931.
- Kim, T. S., Jeong, D. W., Yun, B. Y. and Kim, I. Y. (2002). Dysfunction of rat liver mitochondria by selenite: induction of mitochondrial permeability transition through thiol-oxidation. *Biochem Biophys Res Commun* **294**(5): 1130-7.
- Kramer, K., Jenner, H. and de Zwart, D. (1989). The valve movement response of mussels; a tool in biological monitoring. *Hydrobiologia* **188/189**: 433-443.
- Larabee, J. L., Hocker, J. R., Hanas, R. J., Kahn, F. M. and Hanas, J. S. (2002). Inhibition of zinc finger protein-DNA interactions by sodium selenite. *Biochemical Pharmacology* **64**(12): 1757-1765.
- Le Fur, J. (1989). Modélisation numérique des transferts de radioéléments artificiels en mer de Manche (processus hydrodynamiques, biologiques et sédimentaires). Claude Bernard Lyon I.
- Le Penec, M., Barillé, L. and Grizel, H. (2003). The gills. in "An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs". H. Grizel.
- Lee, W. and Wang, W. (2001). Metal accumulation in the green macroalga *Ulva fasciata*: effects of nitrate, ammonium and phosphate. *The Science of the Total Environment* **278**: 11-22.
- Lemly, A. (1993a). Metabolic stress during winter increases the toxicity of selenium to fish. *aquatic toxicology* **27**: 133-158.
- Lemly, A. (2004). Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **in press**.
- Lemly, A. D. (1993b). Teratogenic effects of selenium in natural populations of freshwater fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **26**(2): 181-204.
- Lemly, A. D. (1999). Selenium impacts on fish: an insidious time bomb. *Human and Ecological Risk Assessment* **5**: 1139-1151.
- Lemly, A. D. (2002a). Symptoms and implications of selenium toxicity in fish: The Belews Lake case example. *Aquatic Toxicology* **57**(1-2): 39-49.
- Lemly, A. D. (2002b). Toxic effects of selenium in fish. in "Selenium Assessment in Aquatic Ecosystems. A guide for hazard evaluation and water quality criteria". S. series: 39-58.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with a folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Luoma, S. N., Johns, C., Fisher, N. S., Steinberg, N. A., Oremland, R. S. and Reinfelder, J. R. (1992). Determination of selenium bioavailability to a benthic bivalve from particulate and solute pathways. *Environmental Science and Technology* **26**(3): 485-491.
- Macfie, S. M., Tarmohamed, Y. and Welbourn, P. M. (1994). Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* : The influence of the cell wall and pH. *Arch Environ Contam Toxicol*, **27**: 454-458.

- Markich, S., Brown, P., Jeffree, R. and Lim, R. (2000). Valve movement responses of *Velesunio angasi* (Bivalvia:Hyriidae) to manganese and uranium: An exception to the free ion activity model. *Aquatic Toxicology* **51**: 155-175.
- Maruyama, K. (1997). Connectin/titin, giant elastic protein of muscle. *The FASEB Journal* **11**.
- Masilamoni, J. G., Nandakumar, K., Jesudoss, K. S., Azariah, J., Satapathy, K. K. and K.V.K., N. (2002). Influence of temperature on the physiological responses of the bivalve *Brachidontes striatulus* and its significance in fouling control. *Marine Environmental Research* **53**: 51-63.
- Massabuau, J. C. and Tran, D. (2003). Ventilation, a recently described step limiting heavy metal contamination in aquatic animals. *J Phys IV* **107**: 839-843.
- Matés, J. M. and Sánchez-Jiménez, F. (1999). Antioxydant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Frontiers in Bioscience* **4**: d339-345.
- McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). *J Biol Chem* **25**: 6049-55.
- Medler, S. and Silverman, H. (2001). Muscular alteration of gill geometry in vitro: implications for bivalve pumping processes. *Biol Bull* **200**(1): 77-86.
- Meybeck, M. (1981). "River inputs to ocean systems." New York.
- Moreno, P., Quijano, M. A., Gutiérrez, A. M., Pérez-Conde, M. C. and Camara, C. (2004). Study of selenium species distribution in biological tissues by size exclusion and ion exchange chromatography inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica chimica acta* **524**: 315-327.
- Morlon, H. (2005). Mécanismes de prise en charge du sélénite -Se(IV)- chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Bioaccumulation et effets induits sur la croissance et l'ultrastructure. *Thèse Université Bordeaux I*.
- Morlon, H., Fortin, C., Floriani, M., Adam, C., Garnier-Laplace, J. and Boudou, A. (2005). Toxicity of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Comparison between effects at the population and sub-cellular level. *Aquat Toxicol* **73**(1): 65-78.
- Morton, B. and Tong, K. Y. (1985). The salinity tolerance of *Corbicula fluminea* (Bivalvia: corbiculacea) from Hong Kong. *Malacological review* **18**: 91-95.
- Nakamuro, K., Okuno, T. and Hasegawa, T. (2000). Metabolism of selenoamino acids and contribution of selenium methylation to their toxicity. *Journal of Health science* **46**(6): 418-421.
- Nigro, M. and Leonzio, C. (1996). Intracellular storage of mercury and selenium in different marine vertebrates. *Marine Ecology-Progress Series* **135**(1-3): 137-143.
- Nuclide 2000 (1999). Nuclide 2000 : an electronic chart of nuclides., Communauté Européenne.
- Ogle, R. S. and Knight, A. W. (1996). Selenium bioaccumulation in aquatic ecosystems .1. Effects of sulfate on the uptake and toxicity of selenate in *Daphnia magna*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **30**(2): 274-279.
- Ohlendorf, H. M. (2002). The birds of Kesterson Reservoir: a historical perspective. *Aquatic Toxicology* **57**(1-2): 1-10.
- Palace, V. P., Spallholz, J. E., Holm, J., Wautier, K., Evans, R. E. and Baron, C. L. (2004). Metabolism of selenomethionine by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos can generate oxidative stress. *Ecotoxicol Environ Saf* **58**(1): 17-21.
- Paquet, F. (1993). Etude expérimentale des biocinétiques de l'americium-241 chez le homard *Homarus gammarus*. Analyse des mécanismes d'accumulation et de détoxification au niveau subcellulaire., CEA.

- Price, N. M., Thompson, P. A. and Harrison, P. J. (1987). Selenium ; an essential element for growth of the coastal marine diatom *Thalassosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* **23**: 1-9.
- Pynnönen, K. S. and Huebner, J. (1995). Effects of episodic low pH exposure on the valve movements of the freshwater bivalve *Anodonta cygnea* L. *Water Research* **29**(11): 2579-2582.
- Rainbow, P. S. and Wang, W.-X. (2001). Comparative assimilation of Cd, Cr, Se, and Zn by the barnacle *Elminius modestus* from phytoplankton and zooplankton diets. *Marine Ecology Progress Series* **218**: 239-248.
- Reinfelder, J. R. and Fisher, N. S. (1994). Retention of elements absorbed by juvenile fish (*Menidia menidia*, *Menidia beryllina*) from zooplankton prey. *Limnology and Oceanography* **39**(8): 1783-1789.
- Reinfelder, J. R., Wang, W. X., Luoma, S. N. and Fisher, N. S. (1997). Assimilation efficiencies and turnover rates of trace elements in marine bivalves: a comparison of oysters, clams and mussels. *Marine Biology* **129**: 443-451.
- Riedel, F., Ferrier, D. and Sanders, J. (1991). Uptake of selenium by freshwater phytoplankton. *Water, Air, and Soil Pollution* **57-58**: 23-30.
- Riedel, G. F. and Sanders, J. G. (1996). The influence of pH and media composition on the uptake of inorganic selenium by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**: 1577-1583.
- Riedel, G. F., Sanders, J. G. and Gilmour, C. C. (1996). Uptake, transformation, and impact of selenium in freshwater phytoplankton and bacterioplankton communities. *aquatic Microbial Ecology* **11**: 43-51.
- Robberecht, H. and Grieken, V. (1982). Selenium in Environmental Waters: Determination, Speciation and Concentration levels. *Talanta* **29**: 823_844.
- Roux, M., Sarret, G., Pignot-Paintrand, I., Fontecave, M. and Coves, J. (2001). Mobilization of selenite by *Ralstonia metallidurans* CH34. *Applied and Environmental Microbiology*: 769-773.
- Saint Denis, M., Labrot, F., Narbonne, J. F. and Ribera, D. (1998). Glutathione, glutathione related enzymes and catalase activities in the worm *Eisenia fetida*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **35**: 594-606.
- Schlekat, C., Lee, B. and Luoma, S. (2002). Assimilation of selenium from phytoplankton by three benthic vertebrates: effect of phytoplankton species. *Marine Ecology Progress Series* **237**: 79-85.
- Schrauzer, G. N. (2000). Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J Nutr* **130**(7): 1653-6.
- Schultz, T. W., Freeman, S. R. and Dumont, J. N. (1980). Uptake, depuration, and distribution of selenium in *Daphnia* and its effects on survival and ultrastructure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **9**(1): 23-40.
- Séby, F., Potin-Gautier, M., Borge, G. and Donard, O. (2001). A critical review of thermodynamic data for selenium species at 25°C. *Chemical Geology* **171**: 173-194.
- Silverman, H., Lynn, J. W. and Dietz, T. H. (1996). Particle capture by the gills of *Dreissena polymorpha*: Structure and function of latero-frontal. *biol bull* **191**: 42-54.
- Simmons, D. B. D. and Wallschläger, D. (2005). A critical review of the biogeochemistry and ecotoxicology of selenium in lotic and lentic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**(6): 1331-1343.
- Slooff, W., de Zwart, O. and Marquenie, J. (1983). Detection Limits of a biological Monitoring system for Chemical water Pollution Based on Mussel Activity. *Bull environ Contam Toxicol* **30**: 400-405.

- Sluyts, H., Van Hoof, F., Cornet, A. and Paulussen (1996). A dynamic new alarm system for use in biological early warning systems. *Environ Toxicol Chem* **15**: 1317-1323.
- Spallholz, J. E. and Hoffman, D. J. (2002). Selenium toxicity: cause and effects in aquatic birds. *Aquat Toxicol* **57**(1-2): 27-37.
- Stewart, M. G. (1978). Kinetics of neutral amino-acid transport by isolated gill tissue of the bivalve *Mya arenaria* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **32**(1): 39-52.
- Stewart, M. S., Spallholz, J. E., Neldner, K. H. and Pence, B. C. (1999). Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. *Free Radic Biol Med* **26**(1-2): 42-8.
- Tapiero, H., Townsend, D. and KD., T. (2003). The antioxydant role of selenium and seleno-compounds. *biomedecine and pharmacotherapy* **57**: 134-144.
- Tessier, A. and Turner, D. (1995). "Metal speciation and Bioavailability in Aquatic Systems".
- Tinggi (2003). Essentiality and toxicity of selenium and its status in australia: a review. *Toxicology Letters* **137**: 103-110.
- Tran, D. (2001). Etude des mécanismes de régulation de la ventilation chez le bivalve filtreur *Corbicula fluminea*. Influence de l'oxygène et de l'apport trophique. Application aux problèmes de bioaccumulation et de biodetection du cadmium. Bordeaux, Bordeaux 1.
- Tran, D., Boudou, A. and Massabuau, J. (2000). Mechanism for maintaining oxygen consumption under varying oxygenation levels in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Can J Zool* **78**: 2027-2036.
- Tran, D., Boudou, A. and Massabuau, J. (2001). How water oxygenation level influences cadmium accumulation pattern in the asiatic clam *Corbicula fluminea*: a laboratory and field study. *Environ toxicol Chem* **20**: 2073-2080.
- Tran, D., Boudou, A. and Massabuau, J. (2002). Relationship between feeding-induced ventilatory activity and bioaccumulation of dissolved and algal-bound cadmium in the asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Environ Toxicol Chem* **21**: 327-333.
- Tran, D., Ciret, P., Ciutat, A., Durrieu, G. and JC., M. (2003). Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environ Toxicol Chem* **22**: 914-920.
- Tran, D., Fournier, E., Durrieu, G. and Massabuau, J. C. (2004a). Copper detection in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: optimum valve closure response. *Aquat Toxicol* **66**(3): 333-43.
- Tran, D., Massabuau, J. C. and Garnier-Laplace, J. (2004b). Effect of Carbon dioxide on uranium bioaccumulation in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Environ Toxicol Chem* **23**: 739-747.
- Vandermeulen, J. H. and Foda, A. (1988). Cycling of selenite and selenate in marine phytoplankton. *Mar. Biol. Mar. Biol.* **98**: 115-123.
- Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N. and Panfoli, I. (2000). Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **46**(2): 407-17.
- Vray, F. (1994). Evaluation, modélisation et analyse des transferts expérimentaux du ¹⁰⁶Ru au sein d'un réseau trophique d'eau douce., Montpellier II.
- Wallace, W., Lee, B.-G. and Luoma, S. (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**: 183-197.
- Wallace, W. and Luoma, S. (2003). Subcellular compartmentalization of Cd and zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Marine Ecology Progress Series* **257**: 125-137.

- Wang, C. and Lovell, R. (1997). Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* **152**: 223-224.
- Watling and Watling (1982). Comparative effects of Metals on the Filtering Rate of the Brown Mussel (*Perne perna*). *Bull Environm Contam Toxicol* **29**: 651-657.
- Whanger, P. D. (2002). Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *J Am Coll Nutr* **21**(3): 223-32.
- Williams, M., Ogle, R., Knight, A. and Burau, R. (1994). Effects of sulfate on selenate Uptake and Toxicity in the green alga *Selenastrum capricornatum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **27**: 449-453.
- Wool, I. G. (1996). Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **21**(5): 164-165.
- Zhang, G., Hu, M. and Huang, Y. (1990). Se uptake and accumulation in Marine Phytoplankton and Transfer of S to the clam *Puditapes philippinarum*. *Marine Environmental Research* **30**: 179-190.
- Zhang, J., Wang, H., Zhang, L. and Yan, X. (2005). Comparison of short-term toxicity between Nano-Se and selenite in mice. *Life Sciences* **76**(10): 1099-1109.

Annexes

ANNEXE 1 : Caractéristiques de la source de ⁷⁵Sélénite.



**Isotope Products
Laboratories**

An Eckert & Ziegler Company

24937 Avenue Tibbitts
Valencia, California 91355

Tel 661-309-1010

Fax 661-257-8303

CERTIFICATE OF CALIBRATION GAMMA STANDARD SOLUTION

Radionuclide:	Se-75	Customer:	ISOTOPE PRODUCTS EUROPE, BLASEG GMBH		
Half-life:	119.64 ± 0.24 days	P.O. No.:	32962		
Catalog No.:	7075	Reference Date:	1-Feb-05	12:00	PST
Source No.:	1081-75	Contained Radioactivity:	107.2	µCi	3966 kBq

Physical Description:

A. Mass of solution:	0.99748 g in 1 mL V-Vial
B. Chemical form:	H ₂ SeO ₃ in 0.1M HCl
C. Carrier content:	100 µg Se/mL of solution
D. Density:	0.9996 g/mL @ 20°C

Radioimpurities:

None detected

Radionuclide Concentration: 107.5 µCi/g, 3978 kBq/g ➔

Method of Calibration:

This source was prepared from a weighed aliquot of solution whose activity in µCi/g was determined using gamma ray spectrometry.

Peak energy used for integration:	136.0, 279.5 keV
Branching ratio used:	0.588, 0.250 gammas per decay

Uncertainty of Measurement:

A. Type A (random) uncertainty:	± 0.5 %
B. Type B (systematic) uncertainty:	± 3.0 %
C. Uncertainty in aliquot weighing:	± 0.4 %
D. Total uncertainty at the 99% confidence level:	± 3.1 %

Notes:

- See reverse side for leak test(s) performed on this source.
- IPL participates in a NIST measurement assurance program to establish and maintain implicit traceability for a number of nuclides, based on the blind assay (and later NIST certification) of Standard Reference Materials (as in NRC Regulatory Guide 4.15).
- Nuclear data was taken from IAEA-TECDOC-619, 1991.
- This solution has a working life of 8 months.

Quality Control

17-Dec-04
Date

IPL Ref. No.: 1081-75

ISO 9001 CERTIFIED

Medical Imaging Laboratory

24937 Avenue Tibbitts - Valencia, California 91355

Industrial Gauging Laboratory

1800 North Keystone Street - Burbank, California 91504

ANNEXE 2 : Influence du système de minéralisation (ouvert/fermé) utilisé sur le dosage du sélénium

But : Nous avons testé plusieurs protocoles de minéralisation. L'objectif premier, était de pouvoir évaporer l'échantillon afin de le concentrer au maximum.

- Minéralisation en système ouvert :

Trois protocoles de minéralisation d'échantillon de Se sous formes d'étalons, ont été testés en système ouvert, et le sélénium a été analysé par HG-QFAAS ou ICP-AES. Les échantillons ont été oxydés puis réduits, pour transformer le sélénium total en sélénite, afin de pouvoir être analysé par HG-QFAAS. En parallèle, les échantillons ont été analysés par ICP-AES (qui permet de doser toutes les formes de Se), pour étudier l'efficacité de l'étape de réduction.

	Rendement par ICP-AES	Rendement par HG-FAAS
<hr/> Protocole 1:		
1/ Evaporation de l'échantillon		
2/ Ajout de 3 mL HNO ₃ , 1h30, 105 °C		
3/ Evaporation	20-30 %	20-30 %
4/ Ajout de 3 mL H ₂ O ₂ , 1h30, 105 °C		
5/ Evaporation		
6/ Réduction: HCl 4 M, 90 °C, 45 minutes		
<hr/> Protocole 2:		
1/ Ajout de 3 mL HNO ₃ + 3 mL H ₂ O ₂ , 1h30, 105 °C	55-65 %	55-65 %
2/ Evaporation		
3/ Réduction: HCl 4 M, 90 °C, 45 minutes		
<hr/> Protocole 3:		
1/ Ajout de 3 mL HNO ₃ + 3 mL H ₂ O ₂ , 1h30, 105 °C	75-85 %	75-85 %
2/ Réduction: HCl 4 M, 90 °C, 45 minutes		

Les rendements sont assez faibles et systématiquement inférieurs à 85 % que ce soit par HG-QFAAS ou ICP-AES. Ces résultats nous laissent penser à une volatilisation du sélénium lors de l'étape d'évaporation du sélénium.

- **Minéralisation en système fermé :**

Organes et eaux :

Les échantillons ont été minéralisés en système fermé avec 1 mL d'H₂O₂ + 1 mL d'HNO₃ pendant 1h30 à 100 °C. Ils ont ensuite été réduits avec du HCl à 4 M.

		Concentrations en Se total dans les échantillons (µg·L ⁻¹)			Rendement de la réaction (%)	
		théorie	ICP-AES	HG-QFAAS	ICP-AES	HG-QFAAS
Matrice eau (1mL)	Se(+IV)	50.0	55.2 ± 6.1 59.2 ± 6.5	45.3 ± 0.4 46.1 ± 1.5	110.4 118.4	90.6 118.4
	Se(+VI)	50.0	51.7 ± 6.8 54.8 ± 5.0	44.2 ± 0.9 44.4 ± 0.7	103.4 109.6	103.4 88.8
	SeMet	50.0	56.7 ± 7.5 47.7 ± 9.1	45.7 ± 1.2 41.5 ± 0.3	113.4 95.4	113.4 95.4
	Se(+IV)+Se(+VI)+SeMet	150.0	152 ± 1.7 149 ± 3.7	147.7 ± 0.2 148.2 ± 0.6	101.3 99.3	98.5 98.8
	Homogénat de <i>C. fluminea</i>	?	14.1 ± 0.11 13.8 ± 0.45	NA NA	- -	- -
Matrice biologique (0.3 g)	Homogénat+Se(+IV)	50 + ? = 64	67.8 ± 5.4 98.1 ± 4.7	57.0 ± 0.7 88.5 ± 0.5	105.9 153.3	89.1 138.3
	Homogénat+Se(+VI)	50 + ? = 64	74.9 ± 7.0 66.5 ± 6.6	74.5 ± 0.6 70.8 ± 0.8	117.0 103.9	116.4 110.6
	Homogénat+SeMet	50 + ? = 64	68.5 ± 3.4 64.0 ± 6.16	66.5 ± 0.8 64.6 ± 1.16	107.0 100.0	103.9 100.9
	Homogénat+Se(+IV)+Se(+VI)+SeMet	150 + ? = 164	164 ± 9.4 160 ± 16	174.6 ± 6.17 162 ± 6.18	100.0 97.6	106.5 98.8

Les rendements de réaction sont bons. Nous avons bien un problème de volatilisation en système fermé.

Remarque: Nous avons testé l'effet matrice du HNO₃ et H₂O₂ résiduels dans l'échantillon. Les volumes de HNO₃ et H₂O₂ ajoutés au moment de la minéralisation doivent être inférieurs à 5 % du volume total lors du dosage pour ne pas avoir d'effet matrice. Ainsi,

après réduction, les échantillons sont dilués pour ne pas avoir une quantité trop importante de HNO₃ et H₂O₂ dans les échantillons.

Cytosol :

Pour pouvoir doser les échantillons en sortie de chromatographie basse pression, il a fallu les diluer le moins possible et donc mettre le moins possible d'HNO₃ et H₂O₂. Pour cela nous avons essayé plusieurs protocoles de minéralisation en diminuant les volumes. Les échantillons de cytosol ont été « spikés » avec un mélange de 3 formes de sélénium (sélénite, séléniate et SeMet).

		μL HNO ₃ et H ₂ O ₂	Concentrations en Se total dans les échantillons (μg·L ⁻¹)			Rendement de la réaction (%)	
			théorie	ICP-AES	HG-QFAAS	ICP-AES	HG-QFAAS
Matrice eau 1 mL	eau	500	75	73.0 ± 2.3 70.0 ± 2.2	77.7 ± 0.1 76.1 ± 0.9	97.3 93.3	103.6 101.5
	eau	300	75	73.9 ± 1.73 78.3 ± 3.17	75.8 ± 1.6 81.6 ± 0.6	98.5 104.4	101.1 108.8
Matrice cytosol 1 mL	cytosol	500	?	- -	1.04 ± 0.02 1.08 ± 0.03	- -	- -
	cytosol	300	?	- -	1.98 ± 0.03 2.06 ± 0.02	- -	- -
	cytosol + 3 formes de Se	500	75 + ? = 76.1	65.7 ± 5.7 68.1 ± 3.7 67.8 ± 3.6	69.5 ± 1.0 73.1 ± 0.4 70.4 ± 1.5	86.3 89.4 89	91.3 96.1 92.5
	cytosol + 3 formes de Se	300	75 + ? = 76.8	72.8 ± 1.8 70.9 ± 3.1 73.0 ± 2.6	74.8 ± 1.7 73.5 ± 1.0 75.8 ± 1.2	94.7 92.3 95.1	97.4 95.7 95.7
Matrice culot (0.05 à 0.15 g)	culot (0.116 g)	500	?	-	4.74 ± 0.23	-	-
	culot (0.146 g)	500	?	-	5.48 ± 0.2	-	-
	culot (0.156 g)	300	?	-	6.99 ± 0.07	-	-
	culot (0.127 g)	300	?	-	5.74 ± 0.07	-	-
	culot (0.089 g) + 3 formes de Se	500	75 + ? = 81.2	73.5 ± 7.8	70.9 ± 0.6	90.5	87.3
	culot (0.099 g) + 3 formes de Se	500	75 + ? = 81.9	71.1 ± 4.0	76.1 ± 6.1	92.9	92.9
	culot (0.073 g) + 3 formes de Se	300	75 + ? = 80.1	74.7 ± 1.9	73.5 ± 0.04	93.3	91.8
culot (0.049 g) + 3 formes de Se	300	75 + ? = 78.4	66.7 ± 2.5	69.1 ± 0.1	85.1	88.1	

Les résultats indiquent que l'on peut minéraliser jusqu'à 2 mL de cytosol en sortie de colonne avec uniquement 0.3 mL de HNO₃ et 0.3 mL de H₂O₂.

RÉSUMÉ

Le sélénium est un micronutriment essentiel pour la majorité des organismes vivants. Cependant, des effets toxiques du sélénium dans de nombreux écosystèmes ont été rapportés dans la littérature. La compréhension de cette toxicité est rendue difficile par la complexité des degrés d'oxydation du sélénium dans l'environnement.

Le but de ce travail de thèse était d'acquérir des connaissances sur les facteurs physiologiques et environnementaux impliqués dans les processus de bioaccumulation et de toxicité du sélénium chez le bivalve filtreur *C. fluminea*. Les objectifs étaient : i) de définir quels étaient les facteurs impliqués dans les processus de bioaccumulation du sélénium chez le bivalve ; ii) de caractériser la bioaccumulation du sélénium à différents niveaux d'organisation biologique ; iii) d'appréhender les effets toxiques du sélénium.

Les premières expériences menées à court terme (3 jours), ont permis de souligner l'importance de la spéciation chimique du sélénium dans les processus de bioaccumulation chez *C. fluminea*. Il a été montré que la forme organique, sélénométhionine, était beaucoup plus biodisponible que les formes inorganiques, sélénite et séléniate. En outre, la voie de transfert est apparue déterminante dans ces processus. Les formes inorganiques ont été mieux extraites par la voie trophique, tandis que la SeMet a été mieux extraite par la voie directe. Dans nos conditions expérimentales, la ventilation du bivalve n'a pas été un facteur limitant pour la bioaccumulation du sélénium par la voie directe, mais elle l'a été pour la bioaccumulation du sélénium par la voie trophique. La ventilation du bivalve a largement été affectée par la présence de sélénite et de SeMet dissous.

Nous avons montré que les cinétiques de bioaccumulation de la SeMet étaient beaucoup plus rapides que celles du sélénite. En outre, apporté sous forme de SeMet, le sélénium internalisé est apparu relativement rémanent dans le corps mou de *C. fluminea* par rapport au Se apporté sous forme de sélénite. Les répartitions subcellulaires et moléculaires de ces formes ont été très différentes.

Enfin, il a été montré que la SeMet et le sélénite pouvaient engendrer de faibles altérations du statut anti-oxydant et de l'expression génétique chez *C. fluminea*. En revanche, d'importantes modifications de l'ultrastructure du tissu branchial ont été observées après exposition au sélénite et à la SeMet.

Mots clés : bivalve, apport trophique, sélénium, spéciation, bioaccumulation, ventilation, toxicité

ABSTRACT

Selenium is an essential micronutrient for most of living organisms. However, toxic effects in several ecosystems have been reported in the literature. Toxicity comprehension is difficult due to the complexity of Se oxidation states in the environment.

The aim of this thesis work was to acquire knowledge on the physiological and environmental factors involved in bioaccumulation and toxicity processes in the freshwater filter-feeding bivalve *C. fluminea*. The aims were : i) to define what the factors involved in Se bioaccumulation processes in the bivalve are, ii) to characterize Se bioaccumulation at different biological organisation levels, iii) to investigate Se toxic effects.

First experiments, carried out for short term exposure duration (3 days), have permitted to underline the importance of Se chemical speciation in bioaccumulation processes in *C. fluminea*. It has been shown that the organic form, selenomethionine, was much more bioavailable than the inorganic forms, selenite and selenate. Moreover, the route of transfer was determinant in those processes. Inorganic forms have been better extracted by trophic route, whereas selenomethionine has been better extracted by the direct route. In our experimental conditions, ventilation of the bivalve has not been a limiting factor for Se bioaccumulation by the direct route, whereas it has been for bioaccumulation by the trophic route. Ventilation has been largely modified by the presence of dissolved selenite and selenomethionine.

We have shown that the kinetics of selenomethionine bioaccumulation are much more fast than those of selenite. Moreover, when introduced as SeMet, internalised Se appeared to be relatively remanent in soft tissues of *C. fluminea* in comparison with Se internalised when introduced as selenite. Subcellular and molecular distributions of these forms were very different.

Finally, it has been shown that selenomethionine and selenite could generate weak alterations of the anti-oxidant status and the genetic expression in *C. fluminea*. On the other hand, important ultrastructural modifications of gill tissues have been observed after selenite and selenomethionine exposure.

Key words : bivalve, food supply, selenium, speciation, bioaccumulation, ventilation, toxicity