



HAL
open science

Etude des impacts toxiques des contaminants chimiques du Bassin d'Arcachon sur l'huitre cultivée *Crassostrea* *gigas* : Approche in-situ et expérimentale

Hugues Bijoux

► **To cite this version:**

Hugues Bijoux. Etude des impacts toxiques des contaminants chimiques du Bassin d'Arcachon sur l'huitre cultivée *Crassostrea gigas* : Approche in-situ et expérimentale. Sciences de la Terre. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0078 . tel-01131184

HAL Id: tel-01131184

<https://theses.hal.science/tel-01131184>

Submitted on 13 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS
SPÉCIALITÉ GÉOCHIMIE ET ÉCOTOXICOLOGIE

Par Hugues, BIJOUX

**ÉTUDE DE L'IMPACT TOXIQUE DES CONTAMINANTS
CHIMIQUES DU BASSIN D'ARCACHON SUR L'HUÎTRE
CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS* ; APPROCHE *IN SITU* ET
EXPÉRIMENTALE**

Sous la direction de : Patrice GONZALEZ et Hélène BUDZINSKI

Soutenue le 19 février 2014

Membres du jury :

Mme BAUDRIMONT, Magalie
M. LAROCHE, Jean
M. BUSTAMANTE, Paco
M. GEFFARD, Alain
Mme. AKCHA, Farida
M. GONZALEZ, Patrice
Mme BUDZINSKI, Hélène

Professeur Université de Bordeaux
Professeur Université de Bretagne Occidentale
Professeur Université de La Rochelle
Professeur Université de Reims
Docteur Ifremer de Nantes
Chargé de recherche CNRS
Directrice de recherche CNRS

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Directeur
Directrice

Titre : Étude de l'impact toxique des contaminants chimiques du Bassin d'Arcachon sur l'huître creuse *Crassostrea gigas* ; approche *in situ* et expérimentale

Résumé : Le bassin d'Arcachon est une lagune semi-fermée qui concentre de forts enjeux économiques grâce à la pratique de l'ostréiculture. Cette activité est affectée depuis une trentaine d'années par des phénomènes de mortalités estivales, et plus récemment par des surmortalités du naissain. Ces travaux se sont intéressés au rôle des polluants majeurs du bassin d'Arcachon dans ce contexte de crise en étudiant leurs effets sur la biologie de *Crassostrea gigas*. Une approche *in situ* a d'abord été adoptée afin d'identifier les contaminants les plus présents dans le milieu naturel. Des opérations de transplantation d'huîtres et des prélèvements de sédiments ont permis de quantifier divers contaminants et d'associer leur présence à des réponses biologiques. Les polluants ainsi identifiés ont ensuite été employés en conditions contrôlées au laboratoire. Trois expérimentations ont été réalisées : la première concerne l'étude des voies de contamination par le tributylétain ; la seconde concerne les effets des pesticides et du cuivre ; la troisième concerne l'effet des HAP sur des huîtres diploïdes et triploïdes. Nos résultats indiquent que les organismes transplantés au cœur de la lagune sont plus exposés aux polluants, en lien avec les caractéristiques hydrodynamiques du système. La plupart des paramètres biologiques étudiés sur le terrain ont par ailleurs montré une saisonnalité liée aux processus de gamétogenèse. Au laboratoire, la plupart des contaminants testés ont induit une réponse adaptative chez les huîtres exposées. Notre étude souligne l'importance de coupler approche de terrain et approche expérimentale pour comprendre le fonctionnement des écosystèmes côtiers.

Mots clés : *Crassostrea gigas* ; Bassin d'Arcachon ; approche *in situ* ; approche expérimentale ; métaux ; pesticides ; hydrocarbures aromatiques polycycliques ; tributylétain ; métallothionéines ; RT-qPCR

Title: Study of the Arcachon Bay's chemical contaminants' toxic impact on the cupped oyster *Crassostrea gigas*; *in situ* and experimental approach

Abstract: The Arcachon Bay is a semi-enclosed lagoon and represents the core of strong economic stakes through the practice of oyster-farming. This activity has been affected for around thirty years by summer mortality events, and more recently by abnormally high death rates of juveniles. This work focused on the role of the Arcachon Bay's main contaminants in this crisis, by studying their effects on the cupped oyster's biology. Firstly, an *in situ* approach was adopted in order to identify the major pollutants of the bay: caged oysters were transplanted and sediments were sampled. The presence of contaminants in the samples was associated to biological responses. Secondly, the contaminants identified *in situ* were used in controlled conditions at the laboratory. Three experimentations were performed; the first dealt with the contamination pathways of tributyltin; the second focused on the biological

effects of pesticides and copper; the third concerned the effects of PAH towards diploid and triploid oysters. Our results indicate that the inner stations present higher accumulation of metals and PAH, in accordance with the hydrodynamic features of the bay. The bioindicators used *in situ* exhibited seasonal trends related to the oysters' gametogenesis. In the laboratory, most of the contaminants used at environmental levels induced an adaptive response of the exposed oysters. Our study highlights the importance of coupling *in situ* and laboratory approaches in order to understand the functioning of coastal ecosystems.

Keywords: *Crassostrea gigas*; Arcachon Bay; *in situ* approach; experimental approach; metal ; pesticides ; polycyclic aromatic hydrocarbons; tributyltin; metallothioneins; RT-qPCR

Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux

UMR EPOC 5805 - Université de Bordeaux – 351, cours de la Libération, 33400 Talence

Remerciements

Ces travaux ont vu le jour dans le cadre des projets ASCOBAR et OSQUAR dont le financement a été assuré par la région Aquitaine, l'Union Européenne (FEDER), le Syndicat Intercommunal du Bassin d'Arcachon (SIBA) et l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR RIPOST). Mes remerciements s'adressent donc dans un premier temps à ces institutions dont le concours a permis la mise en place de cette étude et la rédaction de ce manuscrit.

Merci à mes rapporteurs : Jean Laroche, professeur de l'Université de Bretagne Occidentale, Paco Bustamante, professeur de l'Université de La Rochelle et Alain Geffard, professeur de l'Université de Reims. Votre réactivité et votre professionnalisme m'ont permis de terminer cette thèse dans les meilleures conditions et d'améliorer ce manuscrit avec pertinence et justesse. Merci également à Farida Akcha, chercheuse à l'IFREMER de Nantes qui a accepté d'être examinatrice de ce travail. Nous nous étions rencontrés en congrès et ton travail m'avait déjà beaucoup inspiré. Ta présence dans ce jury a donc eu beaucoup de sens pour moi. Je n'oublierai pas nos échanges riches lors de ma soutenance !

Il est également de bon ton d'adresser ma gratitude aux directeurs de recherche qui m'ont accueilli : Eric Villenave, directeur de l'OASU (Observatoire Aquitain des Sciences de l'Univers), Antoine Grémare directeur de l'UMR EPOC (Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux) et Jean-Charles Massabuau, directeur de l'équipe d'Ecotoxicologie Aquatique à Arcachon.

J'adresse également mes plus vifs remerciements à Patrice et Hélène qui ont encadré ces travaux de thèse. Voilà maintenant 5 ans que nous nous connaissons et que nous travaillons ensemble sur les thématiques du Bassin d'Arcachon. J'ai toujours pu bénéficier de votre expérience, et je considère comme une chance d'avoir pu évoluer professionnellement entre vos deux univers (biologie et chimie). Merci de m'avoir fait confiance durant toutes ces années, de m'avoir offert un cadre de travail privilégié et d'avoir vu mes compétences et mon potentiel lorsque je doutais moi-même de leur existence. Le Bisounours de l'environnement a bien grandi et vous doit une fière chandelle !

Je n'oublie pas Magalie, qui a largement contribué à mon éveil professionnel. Cette passion pour l'écotoxicologie je te la dois en grande partie ! Grâce à tes cours de master dans un premier temps, puis car tu as été une des premières à croire en moi pour le stage de master 2. Je t'exprime donc toute ma gratitude pour ces années d'enseignements et de collaboration très fructueuses ! Je crois que « la boucle a été bouclée » lorsque tu m'as toi-même confié tes étudiants de Licence 3, puis lorsque tu m'as fait le plaisir d'accepter la présidence de mon jury de thèse.

L'environnement professionnel qui a été le mien est très large puisque j'ai eu la chance d'évoluer entre la Station Marine d'Arcachon et le LPTC à Talence. Deux équipes de recherche, ça veut dire deux fois plus de personnes avec qui interagir et donc deux fois plus de rencontres, de conseils, de discussions

scientifiques, de prises de têtes bref : deux fois plus de moments humains et enrichissants. Du côté arcachonnais je remercie donc Damien, Jean-Paul, Alexia, Régine, Fabien, Agnès, Nathalie, Pierre, Bruno, Francis, Henri, Christian, Christelle, Nicolas L., Nicolas S., Alicia, Hugues (le plus beau prénom du monde), Sabrina ! Que ce soit au labo, à table, sur le terrain, en pause, dans le train, au LECLERC ou en cours vous avez tous marqué mon passage à la SMA durant ces 4 ans et je n'oublierai jamais la camaraderie et l'ambiance incroyable qui m'a séduite à l'époque ! Cette « douce folie » qui caractérise les collègues arcachonnais est indéniablement vectrice de bien-être, ce qui ne peut qu'induire du bon travail.

Certaines personnes à Arcachon m'ont cependant encore plus marqué...ou traumatisé, tout dépend du point de vue...Il me semble donc normal d'accorder un peu plus d'espace et de temps à ces gens.

Maman Flo, je te dois beaucoup dans cette aventure...Tout d'abord parce que je sais que tu as fait ma pub quand je postulais pour cette thèse, et surtout parce que étant particulièrement maniaque du rangement, j'ai pu grâce à toi trouver une épaule sur laquelle pleurer quand je ne trouvais plus mon matériel...Au-delà de tout ça tu as aussi été une des personnes les plus gentilles et attentionnées de ce laboratoire et ton sourire comme tes coups de gueule ont ponctué mes journées de rires !

Cerise ! Cerisette ou Kerisette comme on préfère...Miss biomol ! Que de chemin parcouru ! Tu as été une de mes premières « copines » au labo et c'est toi qui m'a (presque) tout appris en « genet' ». Je suis sûr que tu continueras à faire peur à encore pleins de stagiaires qui apprendront auprès d'une des personnes les plus performantes et gentilles de cette équipe ! Vive Namur ! Vives les frites et le Bocadillo ! Vives les potins ! Change rien Chatoune !

Adeline ! Deu-deu, Double-Deu, Deu², Adelin poils aux...mains bien-sûr ! Je ne sais pas si je dois te remercier car au final tu as été très méchante durant ces années...Les cheveux, la prise de poids, la thèse tout y est passé ! T'es une machine Adelin, une de mes plus belles rencontres au labo, une maman spirituelle pour tous les jeunes thésards dont l'enthousiasme inattaquable redonne la motivation même quand tu es au plus bas...Tu as été la plus parfaite des collègues de bureau, et une amie dont le soutien a été indéfectible. Merci pour tout !

Audrey ! La mère Mat ou Mat tout court ! Le diabolique acolyte de l'agent Double Deu...Quand c'était pas une c'était l'autre ! Une véritable alliance pour me descendre plus bas que terre et cela jusque sur mon film de soutenance ! Je me souviendrai des 15 kg...de neurones ! De très nombreux souvenirs nous lient actuellement, fédérés autour d'un élément liant : la bière (parfois le martini). Je crois que nous avons beaucoup de points communs. Ton amitié précieuse a aussi été un soutien de chaque instant à Arcachon et notre histoire ne s'arrête pas là !

Pierre-Yves ! Piwi ou Piwicus maximus ! Gladiateur de l'ICP ! Grand ordonnateur de la Flamme et Vizir du four à Graphite ! Un petit Breton naturalisé ! Quel plaisir cela a été de te voir arriver en master 2, puis rester ensuite et prendre de la bouteille. Ta rigueur au niveau professionnel et scientifique t'ouvriront toutes les portes j'en suis sûr. Ton amitié a eu également beaucoup de sens

pour moi durant ces années et ta perpétuelle bonne humeur a été extrêmement rafraîchissante lorsque le stress de la thèse montait... Notre histoire ne s'arrête pas là !

Lucie ! Mamie Lucie, Baillon, La Mère Baillon, Yonyon, Yon, Pêché-Désir... J'en passe et des meilleures ! Ton voisinage dans la vie comme au travail a été un bonheur de chaque instant. Je n'oublierai jamais ta petite tête rousse dépasser au fond du couloir en fin de journée « Bijoux tu t'magnes ?! ». Entre les congrès et les soirées, le train et le tram, les alarmes le week-end au labo et les terrasses en été, je crois pouvoir affirmer que nous avons passés beaucoup d'instant inoubliables et que nous sommes devenus de vrais amis ! Ne change rien ma belle t'es la meilleure !

J'ai enfin une petite pensée pour Amina, notre petite amie discrète et toujours souriante ! Aminette merci pour ce sourire et les moments passés ensemble. Tu as toujours répondu présente et filé droit sans te plaindre pendant que nous autres n'arrêtions pas de chouiner ! Je te remercie donc pour ta bienveillance et te souhaite tout le meilleur pour l'avenir.

Du côté de Talence, je tiens à remercier tous les collègues : Karyn, Sylvie, Patrick Pa., Patrick Po., Laurent, Pierre V., Pierre L., Marie-Hélène, Maylis, Edith, Nathalie G. Nathalie T., Manu, Mohamed et Claire. Je n'oublie pas les étudiants, ceux d'avant comme les nouveaux ! Avec Caro, ma Némésis du jardinage (moi aussi j'aurai un érable du Japon un jour !) et la plus grande professionnelle de l'évaporation que le monde aie jamais connu ; Yan, avec qui chaque instant partagé au bureau était un plaisir, entre débats scientifiques animés et soirées arrosées, décidément les Bretons sont vraiment de belles personnes ; Justine, Fiprustin ou Crustinette, la reine du Dodutella ® et du macaron, mon éternelle rivale de pâtisserie et mon dealer officiel de M&Ms ; Hoï, désormais bien loin mais dont la gentillesse a aussi marqué le quotidien du bureau 204 ; Nath, qui m'a littéralement prêté son épaule pour pleurer quand ça n'allait plus et dont je me souviendrai des chansons ; Gabriel, le tennis-man super bronzé polyglotte, j'ai toujours du mal à voir quand tu plaisantes et désolé pour tous ces « High five dans le vent » ! ; Max, dont le rire « remarquable » et le look coloré ont ajouté beaucoup de fun dans mon quotidien au labo ; Mathilde, dont le sourire espiègle et la gentillesse ne passent pas inaperçus (je me souviendrai de tes super tartes !) ; Caroline (number 2 !), la fille qui sait ^probablement faire le plus de choses de ses 10 doigts « Oui oui j'ai préparé ces bagels en finissant mon panda en points de croix et en envoyant trois CV » ; Angel, que j'ai pris pour un titulaire quand il était en stage de master 2, et dont la patience a permis de supporter mes éternelles questions sur le projet OSQUAR ; Jonjon, que je connais depuis le master 1 et qui a toujours été présent au boulot comme à l'apéro ; Perinde, travailleuse et rigoureuse, mais aussi sacrément gentille et attentionnée (un jour je ferai les spaetzles comme ta grand-mère) ; Coco, qui avait bien de l'avance sur nous tous et que je n'ai appris à connaître que très tardivement, mais avec qui le courant est passé très facilement ! Merci pour ta patience et tes encouragements ; Papuche (Vincent) tu as été une des découvertes de dernière minute de cette thèse mais tes imitations, ta pêche permanente et ton smile ont été une source de joie durant cette fin de thèse particulièrement stressante. Ne t'inquiètes pas tu ne finiras pas comme moi (prise de poids et perte de cheveux)... Quoique sait-on jamais... ; Chichole (Laura) que je revois toute désespérée après le master 2 et qui rayonne aujourd'hui dans les couloirs du labo. Ton sourire

sadique « Familial » cache je le sais une petite licorne adorable. Merci d'avoir ensoleillé cette fin de thèse également grâce à ton amitié et tous tes petits dessins (une certaine licorne ?) !

Je repense également à Ika, Marion-Justine, Alexia, Fred, Ninette, Sophie... Tous d'anciens thésards dont les conseils avisés et l'expérience ont été les bienvenus dans les instants de doutes. Vos paroles ont été une grande source de réconfort à certains moments... Comme une source d'inquiétude à d'autres !

Une mention spéciale doit être faite à mes stagiaires qui ont beaucoup travaillé sur mes projets et mes manip parfois un peu tordues ! Nico t'as été un chef ! Peut-être un peu maso car après avoir joué au technicien de labo en master 1 tu as quand même re-signé pour le master 2 ! Merci pour ton professionnalisme, ton self-control, ta philosophie et tes grandes compétences face aux nombreux imprévus dont nous avons fait les frais (au hasard : des inondations un samedi ?). Je suis sûr qu'un gars comme toi est promis à un avenir brillant, merci pour tout ! De la même manière, merci à Herehia, la stagiaire la plus « coooooooooool » que j'ai jamais connu ! « On s'prend pas la têtête ! » ! Un calme et un sourire très réconfortants ! J'ai eu raison de te faire confiance puisque tu as fait de super analyses de HAP et que tes chromatogrammes sont encore plus jolis que les miens ! Courage pour la suite et merci pour tout !

Merci à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la préservation de ma santé mentale durant ces quelques années. Merci aux anciens amis de promos ! Cindy, Fanfan, Cécile (demi-neurone et Filouzm) ! On n'a pas passé beaucoup de temps ensemble mais on a un joli passé derrière nous donc merci pour les moments passés ensemble ! Cindy je n'oublierai pas un certain congrès et ta vile trahison (transfert de photos !).

Sur la fin je pense aussi à Cha qui a fait son stage de Master 2 durant ma dernière année de thèse. Tu fais partie des belles rencontres de cette fin de doctorat. Merci à toi d'être encore là et de m'avoir soutenu jusqu'au bout (à me changer les idées deux jours avant ma soutenance !). Ta grande gentillesse m'a beaucoup aidé dans la dernière ligne droite, merci aussi pour tous ces bons moments au Comptoir comme au labo !

Je dois remercier Lucile (Utile), Sam, Audrey (Mie), Julien, Sophie (Fonf) et Yann... Pour votre patience et votre tolérance ! Combien d'apéros j'ai annulé à cause de cette « fichue thèse » ! Eh bien voilà... Vous étiez à la soutenance, vous voyez ce manuscrit, c'était pour ça ! Donc merci d'être restés les mêmes et de ne m'avoir jamais oublié. Votre amitié m'est précieuse, notre histoire est ancienne (on devient vieux !), et tout continue ! Merci les amis !

Tata Boubou (Marjo) j'ai également une pensée pour toi puisque tu fais partie de ceux qui m'ont subi durant ces trois ans. Tu as fait cela avec philosophie, humour et un délicieux cynisme qui a toujours su me faire relâcher la pression quand ça devenait un peu trop tendu ! Ca y est je suis docteur en huîtres et c'est aussi un peu grâce à toi (et à tes mochis...miam).

Je ne peux enfin pas terminer ces remerciements sans conclure sur quelques personnes « clés » :

Julie ! Ju, Toune, Tounette, Toutounette, Chatoune, Chatounette, etc... ! La Reine des potins ! On ne se quitte plus depuis le Master (Meurs la Corbi ! Meurs !). On a traversé les mêmes questionnements (C'est quoi un sessto ?), on s'est soutenus (Y m'a larguééééé !), on a ri (Regarde c'est toi !), on a pleuré, on a nourri les mêmes objectifs et à la fin on s'est retrouvés dans le même labo en thèse ! J'ai envie de dire c'est le destin... Donc un merci colossal : merci pour ton amitié inconditionnelle, merci pour ton soutien au travail comme à la vie, merci pour ton écoute et ton humour, merci d'être allée à la salle de sport et d'avoir arrêté avec moi, merci pour les cadeaux pourris en rentrant de voyage, merci pour les soirées vin-fromage etc... C'est évident : nos relations ont largement dépassé le cadre professionnel et cette thèse n'aurait pas vu le jour sans toi et je serai là à la tienne !

Cécile ! Lilou, Pépette, Princesse, Mamie, Maminette... ! Une autre personne sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour. Tu le sais entre nous c'est une affaire désormais familiale. De Lady Gaga à Paris jusqu'en salle MT à Arcahion, des week-ends manip' à contaminer des huîtres jusqu'aux soirées en boîte sur les quais, tu as été là à chaque instant ; un filet de sécurité, une épaule pour pleurer, mais aussi une sœur pour rire ! Merci d'avoir été la bouffée d'air frais durant cette thèse, de m'avoir aidé à relativiser quand j'avais l'impression d'étouffer, merci de m'avoir supporté et d'être simplement comme tu es. Merci de m'avoir accueilli lorsqu'il y avait besoin et merci de toujours répondre présente : tu m'es très précieuse.

Geoffroy ! Jojo l'Abriocot, Ebé, Eb, Mémé, Mèm, Nam... etc... Qu'on est bête quand on est en couple ! Je termine avec toi car je garde le meilleur pour la fin. Tu m'as souvent regardé l'air décontenancé en te demandant ce qui me mettait dans des états pareils... Même si tu ne comprenais pas tout mon travail tu es resté un véritable roc. Tu m'as recadré quand je m'égarais, tu m'as soutenu et assisté quand je n'en pouvais plus. Je ne peux qu'admirer ta patience car tu es celui qui a le plus vécu cette thèse avec moi, et on peut dire que tu en as bien profité ! Du coup j'ai envie de te dire merci et pardon... En même temps !

Je pense en dernier lieu à ma famille : Claire, Daniel, Marc (merci pour les super dessins !), Alix et tous les petits bouts Elisa, Eva, Gabriel et Edwige, qui ont tous participé à leur manière à l'allègement du stress et de la fatigue. La famille c'est quand même super pour ça ! Merci de m'avoir mené jusque-là et de m'avoir donné l'opportunité de me réaliser.

Si par le plus grand hasard, un étudiant en thèse lit ces remerciements (on le fait tous n'essayez pas de mentir), je lui cède ces quelques paroles pleines de sagesse qu'une personne chère à mon cœur a l'habitude de me dire lorsque je commence à trop me plaindre :

« Vous savez quand même que vous êtes des privilégiés ! »

Ou encore

« Si c'est ce qui t'arrive de pire dans la vie, ce sera pas trop grave ! »

Sommaire général

INDEX DES FIGURES	19
INDEX DES TABLEUX	23
ABREVIATIONS.....	25
INTRODUCTION GENERALE	29
1. QUELS ENJEUX POUR L'OSTREICULTURE ARCACHONNAISE ?	29
2. LES ZONES COTIERES : DES ECOSYSTEMES FRAGILES	30
3. UN CONTEXTE DE CRISE DANS LE BASSIN D'ARCACHON	32
4. IDENTIFICATION DE LA PROBLEMATIQUE ET MOYENS MIS EN ŒUVRE	32
5. LA DEMARCHE SCIENTIFIQUE ET LES OUTILS DEPOSES.....	33
6. STRUCTURE DU MANUSCRIT	36
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	37
1. LE BASSIN D'ARCACHON.....	39
1.1. <i>Caractéristiques</i>	39
1.2. <i>Ecologie</i>	40
1.3. <i>Protection et surveillance</i>	42
1.4. <i>L'ostréiculture dans le bassin d'Arcachon</i>	44
2. L'HUITRE CREUSE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>	49
2.1. <i>Systématique et répartition</i>	49
2.1. <i>Ecologie</i>	49
2.2. <i>Anatomie et biologie générale</i>	50
2.3. <i>Reproduction</i>	51
2.4. <i>Utilisation en écotoxicologie</i>	52
3. CONTAMINATION CHIMIQUE ET STRESS OXYDANT	54
3.1. <i>Le stress oxydant</i>	54
3.2. <i>Les contaminants métalliques</i>	55
3.3. <i>Un contaminant organométallique : le tributylétain</i>	60
3.4. <i>Les contaminants organiques</i>	62
4. LES BIOMARQUEURS	71
4.1. <i>Définition</i>	71
4.2. <i>Les biomarqueurs étudiés</i>	72
5. OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE.....	79
ELEMENTS METHODOLOGIQUES.....	81
1. APPROCHE <i>IN SITU</i>	83
1.1. <i>Les projets ASCOBAR et OSQUAR</i>	83
1.2. <i>Etude complémentaire en été 2012</i>	87
2. PARAMETRES ETUDIES.....	91
2.1. <i>Les indices de condition</i>	91

2.2.	<i>La quantification des métallothionéines</i>	91
2.3.	<i>Les expressions géniques relatives</i>	93
2.4.	<i>Les dosages de contaminants</i>	98
PREMIERE PARTIE : APPROCHE <i>IN-SITU</i>		113
1.	INTRODUCTION DE L'APPROCHE <i>IN-SITU</i>	117
2.	ASCOBAR : BILAN DE LA DEUXIEME ANNEE DE SUIVI (2009 – 2010).....	118
2.1.	<i>Introduction</i>	118
2.2.	<i>Résultats</i>	118
2.3.	<i>Discussion</i>	141
2.4.	<i>Conclusion</i>	150
3.	OSQUAR : BILAN DE DEUX ANNEES DE SUIVI (2010 – 2012).....	151
3.1.	<i>Introduction</i>	151
3.2.	<i>Résultats</i>	151
3.3.	<i>Discussion</i>	173
3.4.	<i>Conclusion</i>	183
4.	FOCUS : ETUDE DES REPONSES LIEES A LA REPRODUCTION ET A UNE EXPOSITION AUX HAPS DURANT L'ETE 2012	185
4.1.	<i>Introduction</i>	185
4.2.	<i>Résultats</i>	186
4.3.	<i>Discussion</i>	196
4.4.	<i>Conclusion</i>	200
5.	BILAN DU SUIVI <i>IN SITU</i>	201
DEUXIEME PARTIE : APPROCHE EXPERIMENTALE		205
1.	INTRODUCTION DE L'APPROCHE EXPERIMENTALE	207
2.	EFFETS DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES ORGANIQUES ET METALLIQUES SUR L'HUITRE : COCKTAILS ET INTERACTIONS	209
2.1.	<i>Contexte de l'étude</i>	209
2.2.	<i>Principaux résultats et conclusions</i>	210
2.3.	<i>Article: Effects of copper and of a cocktail of organic pesticides on Crassostrea gigas: the specific case of the Arcachon Bay</i>	215
3.	EFFETS BIOLOGIQUES D'UN COCKTAIL DE HAPS ADMINISTRE PAR VOIE TROPHIQUE CHEZ <i>C. GIGAS</i> : ROLE DE LA PLOÏDIE ...	235
3.1.	<i>Contexte de l'étude</i>	235
3.2.	<i>Principaux résultats et conclusions</i>	236
3.3.	<i>Article: Response of the cultivated oyster facing an environmentally relevant PAH contamination; a laboratory approach based on the Arcachon bay case</i>	239
4.	VOIE PREFERENTIELLE DE CONTAMINATION DE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> PAR LE TRIBUTYLETAIN ET EFFETS ASSOCIES	255
4.1.	<i>Introduction</i>	255
4.2.	<i>Matériels et méthodes</i>	255
4.3.	<i>Résultats</i>	258
4.4.	<i>Discussion</i>	260
4.5.	<i>Conclusion</i>	262
5.	CONCLUSION DE L'APPROCHE EXPERIMENTALE	263
5.1.	<i>Bilan des observations réalisées</i>	263
5.2.	<i>Les limites de l'approche expérimentale</i>	264

5.3.	<i>Apports et perspectives de l'approche expérimentale</i>	265
CONCLUSION GENERALE		267
1.	L'ETAT DES LIEUX DE LA CONTAMINATION DE LA LAGUNE	267
2.	QUELLE REPONSE DES HUITRES FACE A CETTE CONTAMINATION ?.....	270
2.1.	<i>Les constats faits sur le terrain</i>	270
2.2.	<i>Les résultats de l'approche expérimentale</i>	273
3.	PERSPECTIVES DE RECHERCHE	274
BIBLIOGRAPHIE		277
ANNEXES		303
1.	STRUCTURE DES HAPS EXTRAITS ET ETALONS INTERNES CORRESPONDANTS.....	305
2.	DONNEES « HAPS » DU SUIVI <i>IN-SITU</i>	313
3.	DONNEES « CARBONE ORGANIQUE TOTAL » ET « TAUX LIPIDIQUES » DU SUIVI <i>IN-SITU</i>	321
4.	DONNEES « CROISSANCE » DU SUIVI <i>IN-SITU</i>	323
5.	DONNEES « METAUX » DU SUIVI <i>IN-SITU</i>	327
6.	DONNEES « MTs » DU SUIVI <i>IN-SITU</i>	337
7.	DONNEES « GENETIQUE » DU SUIVI <i>IN-SITU</i>	341
8.	DETAIL DES ACP REALISEES LORS DE L'APPROCHE <i>IN SITU</i>	347
9.	DONNEES DE L'EXPERIENCE <i>IN-SITU</i> « ETE 2012 »	361
10.	[MTs] DE L'EXPERIENCE EN LABORATOIRE « TBT ».....	371
11.	[Cu] ET [MTs] DE L'EXPERIENCE EN LABORATOIRE « PESTICIDES – CUIVRE »	373
12.	PUBLICATION: INVESTIGATING THE RESPONSE OF CUPROPROTEINS FROM OYSTER (<i>CRASSOSTREA GIGAS</i>) AFTER WATERBORNE COPPER EXPOSURE BY METALLOMIC AND PROTEOMIC APPROACHES.....	377

Index des figures

Figure 1 : Principaux transferts entre le Bassin d'Arcachon et les autres bassins de production ostréicole français (adapté de Meresse et Frostin, 2012)	30
Figure 2 : Représentation schématique du fonctionnement d'un écosystème lagunaire (adapté de Lasserre, 1979).....	31
Figure 3 : Différents niveaux d'étude et valeurs associées en écotoxicologie (adapté de Snape et al., 2004)	34
Figure 4 : Bassin versant du Bassin d'Arcachon (Canton et al., 2010)	39
Figure 5 : Représentation schématique du fonctionnement interne d'une lagune semi-fermée (adapté de Lasserre, 1979).....	41
Figure 6 : Espaces protégés du bassin d'Arcachon	42
Figure 7 : Zones Naturelles d'Intérêt Ecologique Faunistique et Floristique du bassin d'Arcachon	42
Figure 8 : Chronologie de la production ostréicole dans le bassin d'Arcachon (adapté de Bouchet et al., 1997a)	45
Figure 9 : Mortalités estivales enregistrées en France entre 1992 et 2006 (adaptée de Soletchnik et al., 2007).....	46
Figure 10 : Schéma des interactions entre l'huître et son milieu pouvant mener à des mortalités (adapté de Samain, 2011) ...	47
Figure 11 : Surveillance RESCO des mortalités estivales en 2013 au Tès	48
Figure 12 : Principaux pays producteurs d'huître japonaise (source : www.fao.org).....	49
Figure 13 : Schéma et photo de l'anatomie de <i>Crassostrea gigas</i> (source : Miossec et al., 2009).....	51
Figure 14 : Développement de <i>C. gigas</i> après fécondation (Perrière-Rumèbe, 2012) pour une température de 22 à 24°C.....	52
Figure 15 : Représentation schématique et simplifiée de la production d'EROs par les contaminants traditionnels (adapté de Regoli Francesco, 2012)	55
Figure 16 : Principales voies d'entrée des métaux dans la cellule (adapté de Mason, 2013)	57
Figure 17 : Molécule de tributylétain (TBT)	61
Figure 18 : Structure des 8 HAPs utilisés lors de l'approche expérimentale.....	66
Figure 19 : Structure 3D de l'isoforme 2 des MTs de rat (issue de Vasák, 2005)	73
Figure 20 : Structures des isoformes 1 et 2 des MTs chez <i>C.gigas</i> (adapté de Tanguy et al., 2001)	74
Figure 21 : Représentation schématique de la phosphorylation oxydative (Béguel, 2012)	76
Figure 22 : Représentation schématique des défenses enzymatiques antioxydantes étudiées durant ces travaux (d'après Hermes-Lima, 2004).....	77
Figure 23 : Sites d'échantillonnage de l'approche <i>in-situ</i> (photos : Google Earth)	85
Figure 24 : Schéma récapitulatif du traitement des échantillons après prélèvement.....	86
Figure 25 : Exemple de lames de verres colonisées	88
Figure 26 : Principe d'extraction des métallothionéines	92
Figure 27 : Principe général de la qPCR SYBR Green	94
Figure 28 : Schéma des étapes successives de l'extraction d'ARN	96
Figure 29 : Modèle de plaque 96 puits réalisé en qPCR.....	96
Figure 30 : Principe des dosages par absorption atomique pour le cuivre, le zinc et le cadmium (adapté de Marie, 2005) ...	100
Figure 31 : Schéma simplifié des étapes d'extraction des HAPs des matrices solides	103
Figure 32 : Teneurs en HAPs mesurées dans les blancs de manipulation	108
Figure 33 : Principe de la SPME	110
Figure 34 : Carte des chenaux principaux du Bassin d'Arcachon (Ifremer - 1997)	115
Figure 35 : Masses de corps mou des huîtres cultivées prélevées durant la deuxième année du programme ASCOBAR	119
Figure 36 : Longueurs des coquilles des huîtres cultivées prélevées durant la deuxième année du programme ASCOBAR	119
Figure 37 : Indices de condition des huîtres cultivées prélevées durant la deuxième année du programme ASCOBAR	120
Figure 38 : Concentrations en cuivre mesurées dans les branchies des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR.....	121
Figure 39 : Concentrations en cuivre mesurées dans les glandes digestives des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR.....	122

Figure 40 : Concentrations en cuivre mesurées dans les restes du corps mou des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR.....	123
Figure 41 : Concentrations en zinc mesurées dans les branchies des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR.....	123
Figure 42 : Concentrations en zinc mesurées dans les glandes digestives des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR.....	124
Figure 43 : Concentrations en zinc mesurées dans les restes du corps mou des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR.....	125
Figure 44 : Concentrations en cadmium mesurées dans les branchies des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR.....	126
Figure 45 : Concentrations en cadmium mesurées dans les glandes digestives des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR.....	126
Figure 46 : Concentrations en cadmium mesurées dans les restes du corps mou des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR.....	127
Figure 47 : Evolution des concentrations des 16 HAPs prioritaires dans les huîtres cultivées durant la seconde année du programme ASCOBAR.....	128
Figure 48 : Evolution des concentrations des 16 HAPs prioritaires dans les sédiments durant la seconde année du programme ASCOBAR.....	129
Figure 49 : Evolutions des concentrations en métallothionéines dans les branchies des huîtres cultivées de la seconde année du programme ASCOBAR.....	130
Figure 50 : Evolutions des concentrations en métallothionéines dans les glandes digestives des huîtres cultivées de la seconde année du programme ASCOBAR.....	130
Figure 51 : Evolutions des concentrations en métallothionéines dans les restes du corps mou des huîtres cultivées de la seconde année du programme ASCOBAR.....	131
Figure 52 : Evolution des expressions géniques relatives de 9 gènes de stress dans les branchies des huîtres cultivées de la deuxième année du programme ASCOBAR.....	133
Figure 53 : Evolution des expressions géniques relatives de 9 gènes de stress dans les glandes digestives des huîtres cultivées de la deuxième année du programme ASCOBAR.....	135
Figure 54 : Cercle des corrélations (à gauche) et projection des individus (à droite) - Analyse en Composantes Principales appliquée aux variables des branchies (ASCOBAR année 2).....	138
Figure 55 : Cercle des corrélations (à gauche) et projection des individus (à droite) - Analyse en Composantes Principales appliquée aux variables des glandes digestives (ASCOBAR année 2).....	140
Figure 56 : Evolution de la masse des corps mous des huîtres cultivées durant les deux années de suivi OSQUAR.....	152
Figure 57 : Evolution de la longueur des coquilles des huîtres cultivées durant les deux années de suivi OSQUAR.....	152
Figure 58 : Evolution indices de condition des huîtres cultivées durant les deux années de suivi OSQUAR.....	153
Figure 59 : Evolution des concentrations en cuivre dans les branchies, la glande digestive et les restes du corps des huîtres cultivées des deux années de suivi terrain OSQUAR.....	154
Figure 60 : Evolution des concentrations en zinc dans les branchies, la glande digestive et les restes du corps des huîtres cultivées des deux années de suivi terrain OSQUAR.....	155
Figure 61 : Evolution des concentrations en cadmium dans les branchies, la glande digestive et les restes du corps des huîtres cultivées des deux années de suivi terrain OSQUAR.....	156
Figure 62 : Evolution des concentrations en HAPs dans les huîtres cultivées des deux années de suivi terrain OSQUAR ...	157
Figure 63 : Evolution des concentrations en HAPs normalisées par les taux de lipides dans les huîtres cultivées des deux années de suivi terrain OSQUAR.....	157
Figure 64 : Evolution des concentrations en HAPs dans les sédiments prélevés lors des deux années de suivi terrain OSQUAR (a) et zoom sur les valeurs basses (b).....	158
Figure 65 : Corrélation entre les concentrations en HAPs totaux dans les sédiments et les teneurs en carbone organique total (OSQUAR).....	159

Figure 66 : Proportions relatives des HAPs majoritaire calculées au niveau de chaque site pour les matrices biologiques et sédimentaires.	159
Figure 67 : Evolution des concentrations en métallothionéines dans les branchies des huîtres prélevées lors de la première année de suivi du programme OSQUAR.....	160
Figure 68 : Evolution des concentrations en métallothionéines dans les glandes digestives des huîtres prélevées lors de la première année de suivi du programme OSQUAR.....	161
Figure 69 : Evolution des concentrations en métallothionéines dans les restes du corps mou des huîtres prélevées lors de la première année de suivi du programme OSQUAR.....	161
Figure 70 : Evolution des expressions géniques relatives de 10 gènes de stress dans les branchies des huîtres prélevées durant la première année du programme OSQUAR	163
Figure 71 : Evolution des expressions géniques relatives de 10 gènes de stress dans les glandes digestives des huîtres prélevées durant la première année du programme OSQUAR	164
Figure 72 : Evolution des expressions géniques relatives de 10 gènes de stress dans les branchies des huîtres prélevées durant la deuxième année du programme OSQUAR	166
Figure 73 : Evolution des expressions géniques relatives de 10 gènes de stress dans les glandes digestives des huîtres prélevées durant la deuxième année du programme OSQUAR	167
Figure 74 : Cercle des corrélations (à gauche) et projection des individus (à droite) - Analyse en Composantes Principales appliquées aux variables des branchies (OSQUAR année 1 en haut et année 2 en bas).	169
Figure 75 : Cercle des corrélations (à gauche) et projection des individus (à droite) - Analyse en Composantes Principales appliquées aux variables des glandes digestives (OSQUAR année 1 en haut et année 2 en bas).	171
Figure 76 : Evolution de la masse du corps mou des huîtres diploïdes et triploïdes transplantées durant l'été 2012.....	186
Figure 77 : Evolution des longueurs des coquilles des huîtres diploïdes et triploïdes transplantées durant l'été 2012	187
Figure 78 : Evolution des indices de condition des huîtres diploïdes et triploïdes transplantées durant l'été 2012	187
Figure 79 : Observation macroscopique de la maturité sexuelle des huîtres transplantées en été 2012.....	188
Figure 80 : Concentrations des 16 HAPs prioritaires dans les huîtres échantillonnées en été 2012	189
Figure 81 : Concentrations des 16 HAPs prioritaires dans les sédiments échantillonnés en été 2012	189
Figure 82 : Concentrations des 16 HAPs prioritaires dans l'eau échantillonnée en été 2012.....	190
Figure 83 : Concentrations des 16 HAPs prioritaires dans le microphytobenthos échantillonné en 2012.....	190
Figure 84 : Evolution des concentrations en MTs mesurées dans les branchies des huîtres transplantées en été 2012.	191
Figure 85 : Evolution des concentrations en MTs mesurées dans les glandes digestives des huîtres transplantées en été 2012.	192
Figure 86 : Expressions géniques relatives des 10 gènes de stress étudiés dans les branchies des huîtres transplantées en été 2012.....	194
Figure 87 : Expressions géniques relatives des 10 gènes de stress étudiés dans les glandes digestives des huîtres transplantées en été 2012.....	195
Figure 88 : Evolution des cassures à l'ADN mesurées par le test comète en été 2012.....	196
Figure 89 : Schéma récapitulatif des processus impliqués dans la régulation des réponses biologiques de <i>Crassostrea gigas</i> face à la contamination chimique de son milieu	203
Figure 90 : Principaux résultats et mécanismes de toxicité supposés mis en évidence durant l'exposition des huîtres à un cocktail de pesticides.....	211
Figure 91 : Schéma récapitulatif des principaux résultats et conclusions extraits de l'étude de la contamination en HAPs et de ses effets chez des huîtres diploïdes et triploïdes.....	237
Figure 92 : Schéma du protocole expérimental mis en place pour l'étude des voies de contamination de <i>C.gigas</i> par le TBT	256
Figure 93 : Concentrations moyennes en métallothionéines dans les branchies et la glande digestive (moyenne \pm erreur standard) des huîtres contaminées par voie dissoute et trophique avec du TBT	259
Figure 94 : Résumé des principaux effets observés sur l'huître durant les différentes approches expérimentales.....	263
Figure 95 : Bilan des principaux résultats obtenus lors des approches <i>in situ</i> et expérimentales.	272

Index des tableaux

Tableau 1 : Quelques exemples d'approches expérimentales en écotoxicologie avec <i>Crassostrea gigas</i>	53
Tableau 2 : Propriétés des pesticides utilisés lors des approches expérimentales.....	70
Tableau 3 : Gènes étudiés et séquences des amorces correspondantes.....	75
Tableau 4 : Chronologie des prélèvements réalisées lors des programmes ASCOBAR et OSQUAR.....	84
Tableau 5 : Cinétique des prélèvements pour l'étude in situ de l'été 2012.....	88
Tableau 6 : Résumé des paramètres mesurés et présentés dans le manuscrit pour l'approche <i>in-situ</i>	90
Tableau 7 : Estimation des LQ des HAPs dans les huîtres, les sédiments et l'eau salée.....	105
Tableau 8 : Validation de l'expérimentateur et robustesse de la méthode – comparaison avec un opérateur expérimenté et utilisation d'une carte de contrôle interne.....	107
Tableau 9 : Vue d'ensemble des quantités de HAPs extraites lors de l'analyse des sédiments et des huîtres issus des échantillons du programme OSQUAR (n = 45 huîtres et n = 47 sédiments).....	108
Tableau 10 : Rendements moyens d'extraction des étalons internes deutérés lors des analyses de sédiments et d'huîtres des échantillons du programme OSQUAR.....	109
Tableau 11 : Rendements obtenus après analyse d'une solution étalon "pseudo-inconnue" en SPME.....	111
Tableau 12 : Paramètres physico-chimiques 2009 - 2010 des eaux des stations Bouée 13 et Eyrac (SOMLIT).....	136
Tableau 13 : Matrice des corrélations de Pearson - Analyse en Composantes Principales appliquées aux variables des branchies (ASCOBAR année 2).....	138
Tableau 14 : Matrice des corrélations de Pearson - Analyse en Composantes Principales appliquées aux variables des glandes digestives (ASCOBAR année 2).....	140
Tableau 15 : Paramètres physico-chimiques 2010 - 2011 des eaux des stations Bouée 13 et Eyrac (SOMLIT).....	168
Tableau 16 : Résultats de l'ANOVA à deux facteurs réalisée pour la comparaison des effets du temps et du traitement sur les concentrations en MT des huîtres exposées au TBT.....	258
Tableau 17 : Facteurs d'induction moyens de 10 gènes de stress dans les branchies et la glande digestive des huîtres contaminées par du TBT par voie dissoute et trophique.....	260
Tableau 18 : Médianes des concentrations en contaminants mesurées dans les huîtres issues du terrain – comparaison entre les données du ROCCH et celles des projets région Aquitaine.....	269

Abréviations

- AchE** : activité acétylcholinestérase
ACN : acétonitrile
ACP : analyse en composantes principales
act : gène de la protéine actine (protéine : ACT)
Acte : Acénaphthène
Acty : Acénaphthylène
ADN : acide desoxyribonucléique (= DNA)
ADP : adénosine diphosphate
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AMPA : aminométhyl phosphonic acid
An : Anthracène
Ar : Arguin
ARCHYD : réseau HYDrologique du bassin d'ARCachon
ARNm : acide ribonucléique messenger (= RNA)
ASCOBAR : Apports Scientifiques face à la problématique COncchylicole du bassin d'Arcachon
ATP : Adénosine TriPhosphate
BaA : benzo(a)anthracène
BaP : benzo(a)pyrène
BbF : benzo(b)fluoranthène
BkF : benzo(k)fluoranthène
Bé : Bélaisaire (= Be)
BLM : Biotic Ligand Model
BP : benzo(g,h,i)pérylène
Br : branchies
C. gigas : *Crassostrea gigas*
CAS (numéro) : Chemical Abstract Service
cat : gène de la catalase (protéine : CAT)
Chl a : chlorophylle a
Chrys : Chrysène
CO : Carbone Organique
CNC : Comité National de la Conchyliculture
coxI : gène de la sous-unité I de la cytochrome oxydase (protéine : COXI)
C_t : cycle treshold
cyp : gène du cytochrome P450 (protéine : CYP)
DahA : dibenzo(a,h)anthracène
DBT : dibutylétain
DCM : dichlorométhane
EC : effect concentration (ex. EC₅₀ : 50% d'effet)
ERO : Espèce Radicalaire de l'Oxygène (= ROS)
ES : erreur-standard (= SEM)
ET : écart-type (= SD)
ETM : Element Trace Métallique
Ey : Eyrac

FAD : cofacteur Flavine Adénine Dinucléotide
FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations
Fe : Fluorène
Fluo : Fluoranthène
Gb : Grand banc
GC/MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse
Gd : glande digestive
GISD : Global Invasive Species Database
gpx : gène de la glutathion peroxydase (protéine : GPX)
GR : glutathion réductase
GSH/GSSG : glutathion réduit/glutathion oxydé
gst : gène de la glutathion-s-transférase (protéine : GST)
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HAPs : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (= PAH)
Hb : hémoglobine
hsp : gène des heat shock protein
IARC : International Agency for Research on Cancer
IC : Indice de Condition
IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER
INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
INPN : Inventaire National du Patrimoine Naturel
Io : Île aux oiseaux
IP : indéo(1,2,3-c,d)pyrène
IRSTEA : Institut de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture
ISSG : Invasive Species Specialist Group
Lt : Le Tès
m/z : rapport masse/charge
MAC : Maximum Acceptable Concentration
MBT : monobutylétain
MDR : MultiDrug Resistance protein
MES : Matières En Suspension
MOREST (projet) : MORTalités ESTivales
mt : gène des métallothionéines (*mt1* : isoforme 1 ; *mt2* : isoforme 2)
MT : métallothionéine (MT1 : isoforme 1 ; MT2 : isoforme 2)
MTF : Metal-responsive Transcription Factor
mxr : gène des multixenobiotic resistance protein (protéine : MXR)
N : Naphthalène
NAD : cofacteur Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NQE-MA : Norme de Qualité Environnementale Moyenne Annuelle
O₂⁻ : ion superoxyde
OE : organisme entier
OH : radical hydroxyle
OMS : Organisation Mondiale de la Santé (= WHO)
OsHV-1 : Oyster HerpesVirus type 1
OSPAR (convention) : Oslo - PARIS
OSQUAR : OStréiculture et Qualité du milieu ; approche intégrée du bassin d'Arcachon

PAHs : Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (= HAPs)
Phe : Phénanthrène
PCB : Polychlorobiphényle
PCR : polymerase chain reaction (RT-qPCR : Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction)
PNEC : Predicted Non Effect Concentration
Pyr : Pyrène
R : restes du corps mou
REBENT : REseau BENThique
REMI : REseau de contrôle MICObiologique
REMORA : REseau MOLLusques des Rendements Aquacoles
REPAMO : REseau de PAtHologie des MOLLusques
REPAR : REseau de Surveillance des Pesticides sur le Bassin d'Arcachon
REPHY : REseau d'observation et de surveillance du PHYtoplancton et des phycotoxines
RESCO : RESeau d'observation CONchylicole
ROCCH : Réseau d'Observation de la Contamination CHimique
ROS : Reactive Oxygen Species (= ERO)
S : salinité
SAAE : spectrométrie d'absorption atomique électrothermique
SAAF : spectrométrie d'absorption atomique à flamme
SD : standard deviation (= ET)
SEM : standard error of the mean (= ES)
SIBA : Syndicat Intercommunal du Bassin d'Arcachon
sod : gène de la superoxyde dismutase cytosolique (Cu/Zn ; protéine : SOD)
sodmt : gène de la superoxyde dismutase mitochondriale (Mn ; protéine : SODMT)
SOMLIT : Service d'Observation du Milieu LITtoral
SPME : Solid Phase MicroExtraction
T : température
TBT : tributyltin (= tributylétain)
TOC : total organic carbon (= carbone organique total)
UE : Union Européenne
UNESCO : United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (= Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la culture)
US EPA : United States Environmental Protection Agency
VELYGER (réseau) : obserVER, anaLYser et GERer la variabilité de la reproduction et du recrutement de l'huître creuse en France
WHO : World Health Organization (= OMS)
ZNIEFF : Zone Naturelle d'Intérêt Ecologique, Faunistique et Floristique

Introduction générale

Le bassin d'Arcachon est un écosystème emblématique du sud-ouest Français porteur de valeurs patrimoniales majeures. Dans un contexte écologique et économique de crise, et dans un souci de gestion durable des ressources, un besoin important de connaissances se fait sentir concernant le fonctionnement de cet hydrosystème. Nos travaux se positionnent dans cette dynamique et s'intéressent particulièrement aux effets de la pollution de la lagune sur une espèce emblématique : l'huître japonaise.

1. Quels enjeux pour l'ostréiculture arcachonnaise ?

L'huître japonaise ou encore l'huître du pacifique *Crassostrea gigas* est un organisme présentant un intérêt majeur au niveau économique. C'est une espèce très largement exploitée à travers le monde dont l'importance peut être résumée en quelques chiffres clés.

D'après la « Food and Agriculture Organization of the United Nations » (Service des statistiques et de l'information du Département des pêches et de l'aquaculture, 2012), les mollusques représentaient en 2010 environ 23,6 % de la production aquacole mondiale, ce qui équivaut à 14,2 millions de tonnes dont 4,5 millions de tonnes (FAO, 2013) d'huîtres (soit 32% toutes espèces confondues). Plus spécifiquement, la production de l'espèce *Crassostrea gigas* s'élevait à 661 500 tonnes (environ 15% de la production d'huîtres) dont 505 000 tonnes en Asie (76%), 105 000 tonnes en Europe (16%) et 39 500 tonnes en Amérique (6%).

L'Europe se positionne donc comme un des producteurs principaux d'huîtres japonaises à l'échelle mondiale. Dans ce contexte, la commission européenne (Commission Européenne Eurostat, 2013) rapporte un tonnage en France de plus de 80 000 t en 2010, ce qui confère à ce pays le premier rang européen pour la production d'huîtres japonaises. L'ostréiculture française est dominée par l'exploitation de *Crassostrea gigas* (54% de la production conchylicole – (“Comité National de la Conchyliculture (CNC),” 2011)) et se positionne au quatrième rang mondial après la Chine, le Japon et la Corée (Meresse et Frostin, 2012).

Cette activité est soutenue en France sur la majorité des zones côtières telles que la Normandie, la Bretagne, les Pays de la Loire, la région Poitou-Charentes, la côte méditerranéenne et l'Aquitaine, plus spécifiquement au niveau du bassin d'Arcachon. Ce dernier a assuré la production en 2010/2011 d'environ 7000 tonnes d'huîtres japonaises, ce qui équivaut approximativement à 8,5% de la production nationale cette année.

Même si cette production n'est pas la plus élevée au niveau national, la lagune concentre des intérêts fondamentaux pour la filière puisque qu'elle abrite l'un des premiers centres producteurs de naissain en France comme l'illustre la Figure 1. Cette activité concerne par ailleurs plus de 300 entreprises et induit un recours important aux emplois saisonniers durant la période des fêtes, ce qui souligne l'importance économique de la filière.

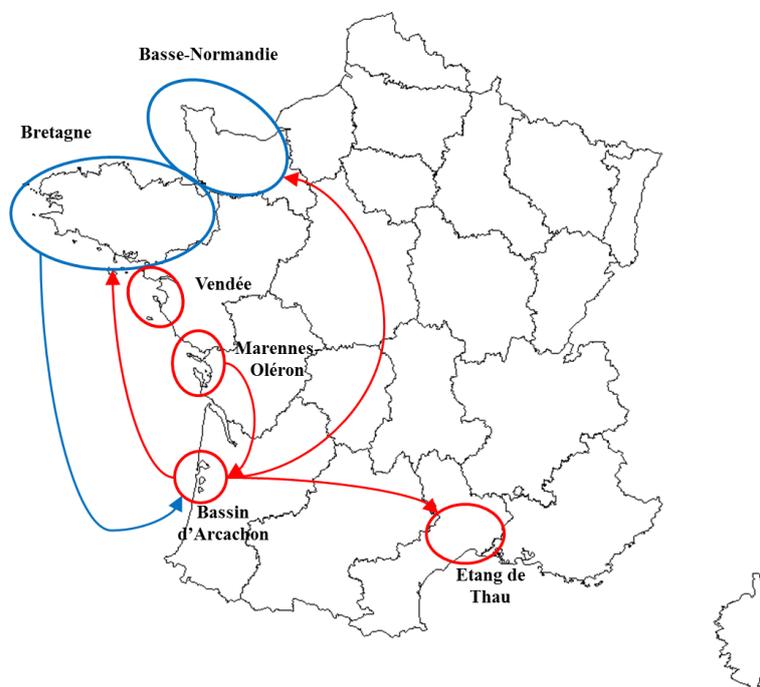


Figure 1 : Principaux transferts entre le Bassin d'Arcachon et les autres bassins de production ostréicole français (adapté de Meresse et Frostin, 2012)

Légende : en rouge les zones de captage/grossissement et transfert de naissain ; en bleu les zones de grossissement et transfert d'huîtres adultes.

2. Les zones côtières : des écosystèmes fragiles

De manière générale, les écosystèmes côtiers tels que le bassin d'Arcachon présentent une importance capitale pour l'Homme puisqu'ils concentrent à eux seuls 25% de la production primaire des océans. Ils représentent 8% de la surface des océans et 90% de la pêche de poissons y est réalisée (Eisenreich et al., 2005). Ils fournissent une grande quantité de services (Watson et al., 2005) tels que l'approvisionnement en ressources (pêche, aquaculture), la « régulation du milieu » (climat, qualité de l'eau, protection des tempêtes parfois) et présentent un intérêt culturel majeur (écotourisme, activités récréatives). La forte productivité de ces zones d'interface est à l'origine de leur attractivité importante, expliquant ainsi qu'à l'heure actuelle 40-50% de la population habite à moins de 100 km des côtes.

Cette densité de population s'accompagne d'une pression anthropique croissante en lien avec des activités humaines variées telles que l'agriculture, l'industrie, l'urbanisation (Mee, 2012). Bien que les écosystèmes concernés présentent une certaine résilience (capacité d'un écosystème à retourner à son

état d'équilibre après une perturbation), cet état de fait les fragilise incontestablement dans un contexte de réchauffement global (Barker, 2007).

On peut considérer par ailleurs que certains hydrosystèmes côtiers présentent une fragilité « supérieure » aux autres. C'est notamment le cas des lagunes semi-fermées telles que le Bassin d'Arcachon, qui font l'objet d'une attention particulière à l'instar des mangroves, deltas, estuaires et récifs coralliens de la part de l'UNESCO depuis les années 70 (Lasserre, 1979). Lasserre décrit d'ailleurs les lagunes comme des « écosystèmes sanctuaires, cibles de la croissance économique ». Leur importance écologique se traduit notamment par un rôle de nourricerie, de zone de frai et de point de passage pour certaines espèces migratrices (Newton et al., 2013).

La définition d'un écosystème lagunaire fournie par les Nations Unies (rapportée par (Newton et al., 2013)) est :

“Sea-water bodies situated at the coast, but separated from the sea by land spits or similar land features. Coastal lagoons are open to the sea in restricted spaces”

« Etendues d'eau salée situées sur la côte, mais séparées de la mer par une langue de terre ou par d'autres éléments similaires. Les lagunes côtières sont ouvertes sur la mer par des espaces restreints ».

Leur fonctionnement est complexe et très dynamique. Il dépend des interactions entre de nombreuses variables (Castel et al., 1996) : les échanges avec l'océan (sédiments, eaux marines et éléments associés comme le plancton), les apports continentaux (eau douce des rivières ou des eaux souterraines, matière organique, sédiments) et les paramètres environnementaux traditionnels (courants, marée, énergie solaire, pluie...). La Figure 2 présente schématiquement ces interactions et indique en rouge les potentielles voies d'entrée d'agents chimiques perturbateurs.

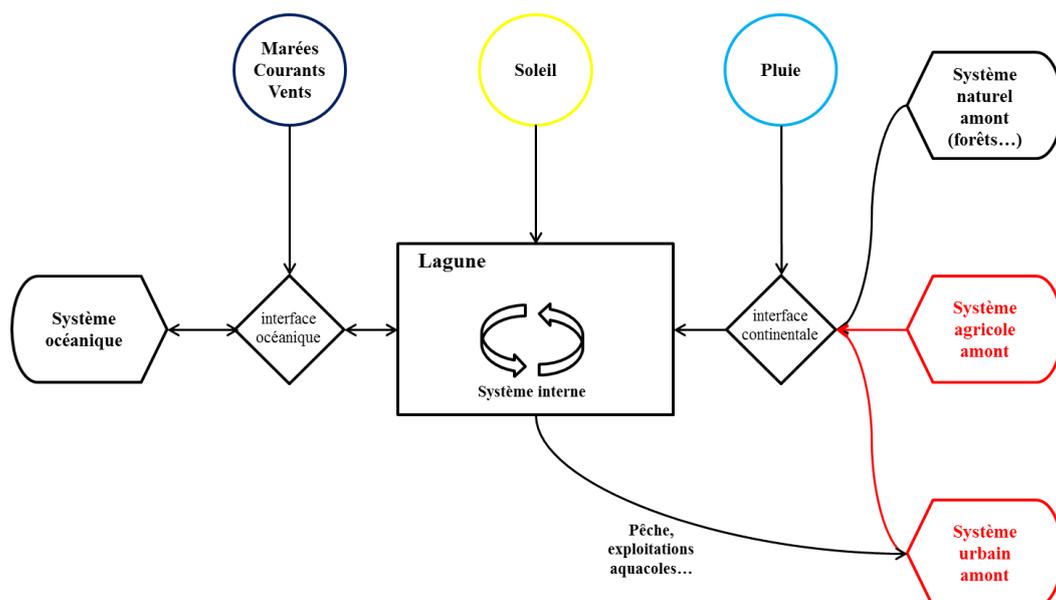


Figure 2 : Représentation schématique du fonctionnement d'un écosystème lagunaire (adapté de Lasserre, 1979)

3. Un contexte de crise dans le bassin d'Arcachon

Le bassin d'Arcachon réunit des conditions de vie idéales (température, salinité, phytoplancton etc...) qui permettent une pratique pérenne de l'ostréiculture et lui confèrent les propriétés nécessaires au captage naturel du naissain. La culture de l'huître est une activité emblématique de cet écosystème puisqu'elle y est pratiquée traditionnellement ; elle est également porteuse d'une forte valeur patrimoniale pour la région.

Cependant l'histoire nous montre qu'en dépit de ces conditions *a priori* favorables, l'ostréiculture a connu de sévères crises par le passé qui ont remis en question sa pérennité. Après les épizooties qui ont ravagé les cheptels d'huîtres plates et portugaises à la fin des années 60 (Bouchet et al., 1997a), l'huître creuse a été introduite dans le bassin d'Arcachon. Très rapidement de nouvelles crises ont frappé les ostréiculteurs qui ont dû faire face aux conséquences de la pollution par le tributylétain dans les années 70 (Alzieu et Thibaud, 1980), puis aux premiers évènements de « mortalités estivales ». Décrits depuis les années 80 en France (Maurer et Comps, 1986) peu de temps après l'introduction de *Crassostrea gigas* dans la lagune, ces évènements ont été caractérisés par des mortalités importantes chez les organismes jeunes (1 an à 2 ans) pouvant dépasser les 30%. De nombreuses études menées à large échelle ont permis d'identifier des facteurs dont les interactions favorisaient l'occurrence de ces mortalités (Samain, 2011) : températures élevées associées à un épuisement physiologique lié à la reproduction et à l'occurrence de stress et d'agents pathogènes opportunistes. A partir de 2008, la situation s'est aggravée avec les premiers évènements de « surmortalités » du naissain pouvant dépasser les 80% du stock (Cochennec-Laureau et al., 2010).

En parallèle à ces crises ostréicoles, une dégradation importante des herbiers à zostères de la lagune a été observée sur les 20 dernières années (Auby et al., 2011; Plus et al., 2010). Considérée historiquement comme l'un des plus grands herbiers à zostères d'Europe, la prairie aquatique du bassin d'Arcachon présente une diminution drastique de sa surface. Le rôle écologique de ces herbiers est pourtant majeur, puisqu'ils stabilisent le sédiment, et font office de zone de frai et de nourricerie pour diverses espèces aquatiques.

On comprend donc que le bassin d'Arcachon présente actuellement les caractéristiques d'une crise écologique, en lien avec la dégradation de son habitat, des activités aquacoles associées et de son paysage avec l'urbanisation croissante de son littoral.

4. Identification de la problématique et moyens mis en œuvre

L'ostréiculture sur le bassin d'Arcachon est une activité directement tributaire de la qualité du milieu naturel puisque les organismes y réalisent la totalité de leur cycle de vie (reproduction, fixation et croissance).

Or, les observations réalisées ces dernières années attestent vraisemblablement d'une dégradation de la qualité globale du milieu naturel (dégradation des herbiers à zostères, mortalités et surmortalités estivales...).

Dans ce contexte, on peut donc s'interroger sur la contribution de la contamination chimique du milieu dans l'avènement de ces « crises ».

Dans un souci de gestion durable, la région Aquitaine a financé divers programmes de recherche dont ASCOBAR (Apports Scientifiques face à la problématique CONchylicole du bassin d'ARcachon) et OSQUAR (OStréiculture et QUalité du milieu ; approche intégrée du bassin d'ARcachon) qui a permis la réalisation de cette étude.

Le programme OSQUAR s'oriente autour de 4 axes de recherches ayant pour but l'amélioration des connaissances du fonctionnement de la lagune. Les approches adoptées sont variées et relèvent du domaine de la biologie, de la chimie, de l'écologie et des sciences humaines et sociales. Notre projet s'intègre dans l'axe 2 du programme et constitue une **double approche chimie-biologie** élaborée pour l'évaluation de la contamination du bassin et de ses effets sur l'huître creuse. La pollution de la lagune et ses conséquences ont été évaluées selon une approche dite **multi-stress** (étude de plusieurs contaminants) et **multi-compartiment** (étude de l'eau, des huîtres, des sédiments...).

5. La démarche scientifique et les outils déployés

L'effet des polluants sur les organismes aquatiques peut s'étudier à différents niveaux (Figure 3). Les conséquences les plus « visibles » d'une contamination concernent dans les cas les plus graves des populations entières (mortalités, effets sur les sex ratio ou sur les effectifs d'adultes, de juvéniles etc...). Un exemple local concerne l'anguille européenne *Anguilla anguilla* dans l'estuaire de la Gironde où les effectifs ont chuté de manière drastique depuis les années 80. De récentes études ont indiqué un rôle potentiel de la contamination en PCB (Tapie et al., 2011) et en cadmium (Pierron et al., 2007) en interaction avec d'autres facteurs abiotiques dans la chute des effectifs. Ce type de situation ne survient en général qu'à la suite d'une contamination aigüe immédiatement délétère, ou résulte d'une contamination chronique sur le long terme.

Les études de terrain présentent une valeur écologique importante et sont des outils de prédilection en écotoxicologie pour identifier les perturbations d'un milieu naturel ou certains « hot spots » (Zhou et al., 2008). Une quantité pléthorique de travaux de ce type ont été déjà réalisés ; un large échantillon est présenté dans l'étude de (Shahidul et Tanaka, 2004). Ces études traditionnellement concentrées sur le niveau de contamination des différents compartiments (biota, sédiments, colonne d'eau) sont désormais assorties de l'emploi de biomarqueurs de stress afin d'identifier les risques potentiels liés à la pollution (Viarengo et al., 2007; Monserrat et al., 2012). **Le couplage entre la chimie et la biologie présente donc une pertinence importante** dans l'évaluation de l'état écologique des hydrosystèmes.

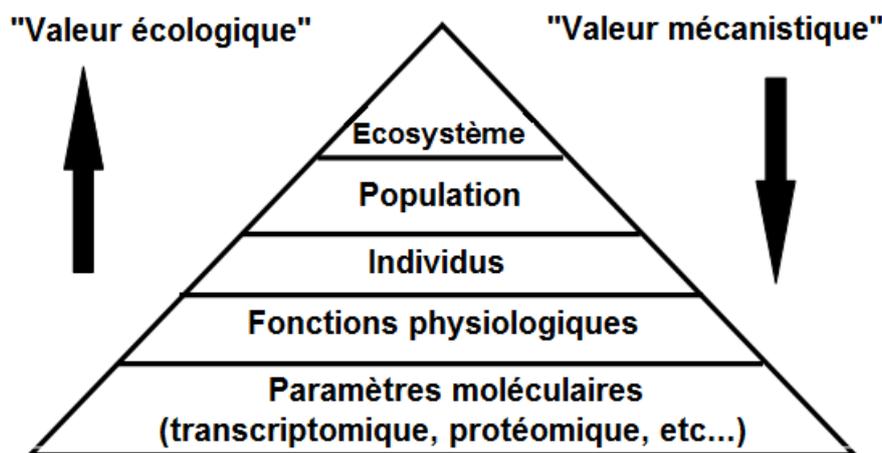


Figure 3 : Différents niveaux d'étude et valeurs associées en écotoxicologie (adapté de Snape et al., 2004)

Cependant, un des problèmes majeurs en se plaçant à l'échelle de l'écosystème et de la population est la complexité dans l'interprétation des données recueillies (Munkittrick et McCarty, 1995). Comme la Figure 2 l'illustre précédemment, les milieux côtiers sont soumis aux variations d'une myriade de facteurs dont les effets directs, indirects et les interactions peuvent potentiellement affecter la physiologie des organismes étudiés (température, marée, courant, vent, ensoleillement, matières en suspension, oxygène dissout etc...). De nouveaux outils en lien avec les approches « omiques » (génomique, protéomique, métabolomique, épigénomique) tels que la puce à ADN permettent actuellement de s'affranchir dans une certaine mesure des effets de ces paramètres environnementaux. En complément d'approches expérimentales, ils peuvent détecter plus spécifiquement « la signature » de polluants d'intérêt (Snape et al., 2004; Steinberg et al., 2008; Van Aggelen et al., 2010). Les approches de terrain sont des outils pertinents de par leur représentativité maximale des conditions de vie du milieu mais ne suffisent cependant pas toujours à établir un réel diagnostic toxicologique puisque des effets interactifs peuvent avoir lieu dans le milieu naturel entre les polluants (effets « cocktails ») ou entre les polluants et les paramètres abiotiques (température, pH, salinité).

A l'inverse, des approches plus mécanistiques en laboratoire (« bottom-up ») peuvent être adoptées pour mieux comprendre les effets d'une variable d'intérêt (ex : la contamination) sur les paramètres suivis (biomarqueurs). Le biais inhérent lié à cette démarche est un éloignement des conditions de vie réelle de l'organisme d'intérêt (Schmitt-Jansen et al., 2008), ce qui peut limiter l'extrapolation des conclusions au milieu naturel. De plus un manque de standardisation des pratiques rend parfois les comparaisons entre études difficiles. Il est par ailleurs impossible de tester tous les mélanges de polluants, ce qui présente une autre limite en termes de représentativité pour cette approche (Beyer et al., 2013). Ce sont ce type de tests qui pourtant permettent d'établir les seuils de toxicité des substances polluantes (Chapman, 2002), auxquels sont appliqués des facteurs de sécurité choisis en fonction de la quantité de données connues sur la toxicité du composé.

Ce « conflit » entre les apports des approches de terrain (*in situ*) et les informations issues d'approches expérimentales, constitue la pierre d'achoppement de l'écotoxicologie (Beketov et Liess, 2012), au même titre que les transferts entre les échelles de travail diverses allant de l'individu à la population. Il semble difficile dans cette optique de répondre aux questions posées de manière absolue (ex : « Quels sont les effets des pesticides sur le fonctionnement de cet écosystème ? »). On peut toutefois considérer que les éléments de réponses apportés par les deux méthodes présentent une certaine complémentarité, et peuvent être intégrés ensemble pour se rapprocher le plus possible de la « réalité ».

L'approche que nous avons adoptée dans ce contexte est un couplage entre des études de terrain, représentatives de la réalité du milieu naturel, et des études en laboratoire, plus réductionnistes mais explicatives.

Nous avons commencé dans le cadre des programmes région, par établir un état des lieux de la contamination de la lagune en déployant des opérations de transplantations d'huîtres japonaises (« caging ») au niveau de stations stratégiques pour l'étude de la contamination du milieu. Les organismes ont été placés sur site en début d'année durant 3 années successives de 2009 à 2011 et des prélèvements réguliers au cours du temps nous ont permis d'étudier leur cinétique de contamination par les métaux (cuivre, zinc, cadmium) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). La contamination du compartiment sédimentaire en HAPs et leur teneur en carbone organique a également été évaluée afin de compléter les études déjà réalisées durant le programme ASCOBAR (Crespo, 2009) concernant les compartiments dissous, particulaires, biotiques et sédimentaires. Les pesticides du bassin d'Arcachon n'ont pas été étudiés dans nos approches mais ont fait l'objet d'une thèse de doctorat soutenue en 2012 (Belles, 2012) faisant un état des lieux détaillé de la contamination par ces composés.

Le dosage des contaminants a été systématiquement associé à un suivi de biomarqueurs moléculaires pertinents en lien avec les effets d'une contamination chimique : les métallothionéines (protéines de séquestration des métaux) et les expressions géniques relatives de 10 gènes connus pour intervenir dans la réponse des organismes face au stress oxydant.

La croissance des huîtres transplantées a été suivie, ainsi que leur stade de reproduction et leur contenu lipidique. Des paramètres accompagnateurs non détaillés dans cette thèse ont également été étudiés durant ce projet : les dosages hormonaux (testostérone et oestradiol) et les dommages à l'ADN par le test des comètes. Les paramètres physico-chimiques de la lagune ont pu être obtenus grâce au service d'observation du milieu littoral (SOMLIT).

Ces travaux sur le terrain nous ont permis d'identifier certaines substances d'intérêt, et ont permis de baser nos études au laboratoire afin d'élucider les mécanismes de toxicité associés aux polluants majeurs du bassin d'Arcachon. Ces informations en lien avec les données de la littérature et les précédentes études réalisées dans la lagune nous ont menées à travailler sur : (1) le tributylétain (TBT)

dont les effets se font encore ressentir de façon marginale sur le littoral ; (2) les pesticides et le cuivre présents de façon significatives et associés aux pratiques agricoles et nautiques du bassin ; (3) les HAPs présents dans les sédiments, les huîtres et leur « bol » alimentaire.

Les biomarqueurs employés durant ces approches sont les mêmes que ceux de l'approche *in situ* (méthallothionéines et expressions géniques) et ont parfois été complétés par d'autres indicateurs grâce aux collaborations établies pour ce projet (spéciation chimique du contaminant, test comète, protéomique).

6. Structure du manuscrit

Ce manuscrit se structure autour de l'approche décrite précédemment. Dans un premier temps, des **éléments bibliographiques** seront présentés dans une synthèse afin de rappeler les bases essentielles à la compréhension de nos résultats. Cette section comprend une présentation : (1) de l'écosystème étudié (caractéristiques, écologie...); (2) de l'organisme d'intérêt (l'huître japonaise); (3) des polluants associés à notre approche expérimentale et 4) du concept de stress oxydant largement évoqué dans nos travaux.

Dans un deuxième temps, les **bases méthodologiques** de notre étude seront exposées. Cette section comprend : (1) un descriptif des protocoles de l'approche de terrain (suivi classique et focus de l'été 2012) ; (2) une présentation des éléments techniques associés au dosage des contaminants et 3) les protocoles relatifs au suivi des différents biomarqueurs étudiés (indices de condition, synthèse de méthallothionéines, expressions géniques relatives).

La première partie du manuscrit décrit et discute les résultats de l'**approche *in situ*** en distinguant trois études : (1) les résultats de la deuxième année du programme ASCOBAR (2009 – 2010) ; (2) les résultats du suivi terrain OSQUAR (2010 – 2011 puis 2011 – 2012) et 3) les résultats d'une expérience complémentaire réalisée en été 2012 durant la période de reproduction de *Crassostrea gigas* (« caging » d'huîtres diploïdes et triploïdes de mai à septembre).

La deuxième partie présente les **approches expérimentales** menées durant ces travaux de thèse. Ces résultats sont présentés sous-forme d'articles pour publication. Dans un premier temps sont exposés les articles relatifs à l'effet du cuivre et des pesticides et à l'effet des HAPs par voie trophique. Ensuite, la contribution aux travaux réalisés sur le TBT est exposée (collaboration scientifique).

Une **conclusion générale** permettra enfin d'intégrer l'ensemble de ces résultats et de tirer les conclusions principales émises lors de cette étude. Les perspectives principales de ces travaux seront également exposées.

Synthèse bibliographique

1.	LE BASSIN D'ARCACHON.....	39
1.1.	<i>Caractéristiques</i>	39
1.2.	<i>Ecologie</i>	40
1.3.	<i>Protection et surveillance</i>	42
1.4.	<i>L'ostréiculture dans le bassin d'Arcachon</i>	44
1.4.1.	Généralités et éléments historiques.....	44
1.4.2.	Les mortalités estivales	45
1.4.2.1.	Histoire	45
1.4.2.2.	Identification des causes.....	46
1.4.2.3.	Les surmortalités	47
2.	L'HUITRE CREUSE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i>	49
2.1.	<i>Systématique et répartition</i>	49
2.1.	<i>Ecologie</i>	49
2.2.	<i>Anatomie et biologie générale</i>	50
2.3.	<i>Reproduction</i>	51
2.4.	<i>Utilisation en écotoxicologie</i>	52
3.	CONTAMINATION CHIMIQUE ET STRESS OXYDANT	54
3.1.	<i>Le stress oxydant</i>	54
3.2.	<i>Les contaminants métalliques</i>	55
3.2.1.	Généralités	55
3.2.2.	Le cadmium	57
3.2.3.	Le zinc.....	58
3.2.4.	Le cuivre	59
3.3.	<i>Un contaminant organométallique : le tributylétain</i>	60
3.3.1.	Généralités	60
3.3.2.	Toxicité	61
3.4.	<i>Les contaminants organiques</i>	62
3.4.1.	Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs).....	62
3.4.2.	Les pesticides.....	67
4.	LES BIOMARQUEURS	71
4.1.	<i>Définition</i>	71
4.2.	<i>Les biomarqueurs étudiés</i>	72
4.2.1.	Les métallothionéines.....	72
4.2.1.1.	Généralités	72
4.2.1.2.	Les MTs chez <i>Crassostrea gigas</i>	73
4.2.2.	Les expressions géniques relatives	74
4.2.2.1.	Le métabolisme mitochondrial	75
4.2.2.2.	La réponse au stress oxydant.....	76
4.2.2.3.	La métabolisation des xénobiotiques	77
4.2.2.4.	La détoxification	78
5.	OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE.....	79

1. Le Bassin d'Arcachon

1.1. Caractéristiques

Le Bassin d'Arcachon est une lagune semi-fermée du sud-ouest français (44°40 N et 1°10 W) d'une superficie d'environ 180 km². Elle n'est reliée au Golfe de Gascogne que par ses passes qui interrompent un long cordon dunaire allant de l'estuaire de la Gironde à l'embouchure de l'Adour (Bouchet et al., 1997b).

Cet hydrosystème est soumis à la marée (cycle tidal semi-diurne), dont l'amplitude varie de 1,1 m à 4,9 m. Ces processus permettent de définir une zone intertidale qui couvre 66% de la surface du bassin. Les zones immergées en permanence consistent en un réseau complexe de chenaux irriguant la quasi-totalité de la surface de la lagune et présentant des profondeurs maximales de 25 m. Les deux principaux chenaux sont celui du Piquey au nord et du Teychan au sud ; ils se subdivisent de plus en plus en remontant dans les terres. La lagune est par ailleurs caractérisée par un environnement géologique largement sableux (« sable des landes »). Les deux seules « îles » identifiables dans le bassin sont l'île aux oiseaux « au centre » et le banc d'Arguin au niveau des passes.

Des apports en eau douce importants sont identifiables et permettent de délimiter un bassin versant considérable de plus de 3000 km² illustré sur la Figure 4 (Canton et al., 2010). Ce bassin versant « direct » (déversement des cours d'eau) est cependant dominé en termes d'apports d'eau douce par la Leyre qui représente le tributaire principal avec environ 73% de ces apports annuels (Plus et al., 2009).

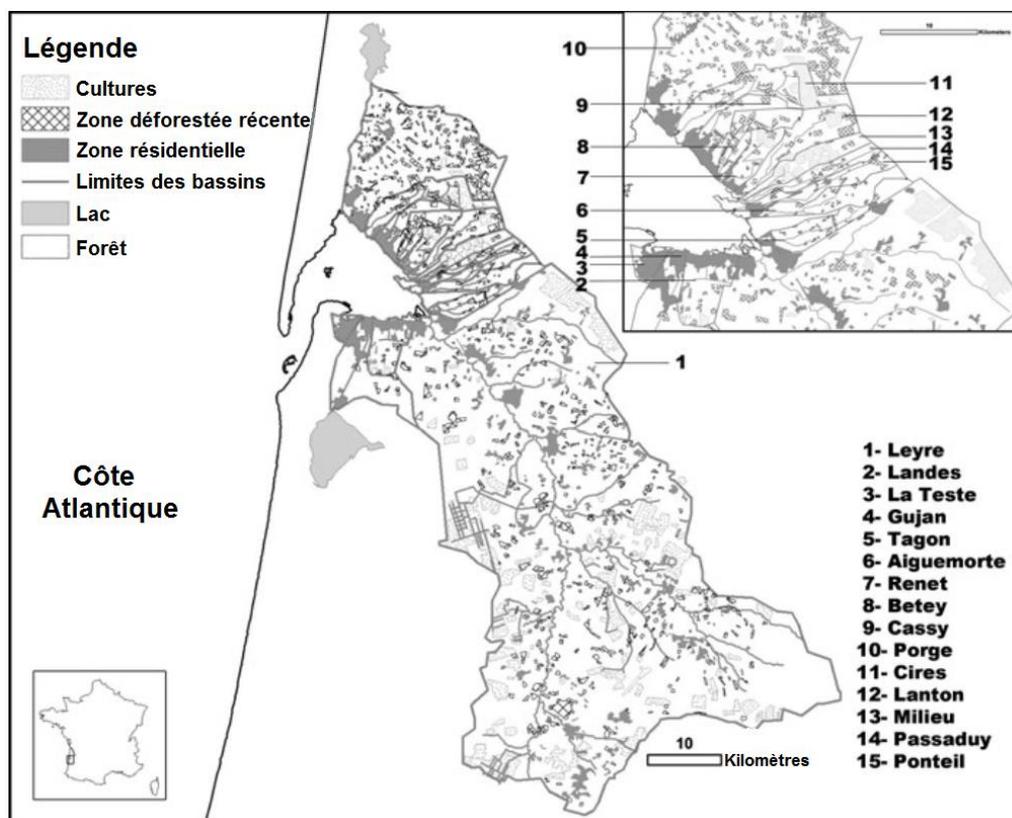


Figure 4 : Bassin versant du Bassin d'Arcachon (Canton et al., 2010)

1.2. Ecologie

La morphologie du bassin d'Arcachon et sa structure unique confèrent à cet écosystème un fonctionnement écologique particulier, en lien avec son hydrodynamisme, son climat et son lien avec le golfe de Gascogne.

Un des éléments les plus remarquables est la présence d'herbiers à zostères. Ces véritables prairies présentent un rôle central dans le fonctionnement biogéochimique et écologique de la lagune : zone de nourricerie, de frai, de protection des sédiments contre l'érosion (Ganthy, 2011). Deux écotypes de zostères se côtoient dans les eaux du bassin : *Zostera marina* est l'écotype le plus grand, et colonise essentiellement les zones subtidales ; *Zostera noltei* qui est l'écotype le plus petit, colonise les zones intertidales et couvre de vastes surfaces (Auby et Labourg, 1996).

Ces prairies présentent cependant un déclin important, avec une régression entre 1988 et 2008 de 33% (22,8 km²) des herbiers à *Zostera noltei* et de 74% (2,7 km²) des herbiers à *Zostera marina* (Plus et al., 2010). La dégradation de ces herbiers est symptomatique d'une modification de la qualité du milieu potentiellement liée à la présence d'herbicides par exemple (Auby et al., 2011).

Le bassin d'Arcachon a parallèlement connu une eutrophisation mise en évidence dans les années 90 (Castel et al., 1996), en lien avec une augmentation des apports en azote minéral par la Leyre (intensification des activités agricoles du bassin versant). Ce seul tributaire est responsable de 90% des apports, qui semblent par ailleurs stabilisés depuis 1995 (Canton et al., 2010).

Bien que vraisemblablement stabilisée, cette eutrophisation du milieu a été corrélée à une modification des communautés benthiques de la lagune. Le développement de macroalgues en lien avec ces apports d'éléments nutritifs supérieurs a effectivement pu contribuer à un envasement de certaines zones et donc à une évolution de ces communautés. Une étude réalisée sur 89 stations en 2002 a par ailleurs permis d'identifier 226 taxa de macrofaune benthique, principalement répartis dans l'espace en fonction des paramètres sédimentaires et de la distance à l'océan (Blanchet et al., 2005).

Le sédiment de la lagune présente donc un rôle structurant sur les communautés qui l'habitent. Il se caractérise notamment par une forte proportion de matière organique. Sa composition a été étudiée en avril 2009 et indique une relative homogénéité spatiale illustrant la grande diversité des producteurs primaires présents. Principalement d'origine autochtone elle est composée de phanérogames dégradées, microphytobenthos, phytoplancton et macroalgues (Dubois et al., 2012).

Ces constats sont cohérents avec les travaux concernant la production primaire phytoplanctonique du bassin. Il a été montré que cet hydrosystème était caractérisé par la récurrence de floraisons planctoniques hivernales (janvier – mars) liées à un inoculum océanique et à des conditions de luminosité favorables (Glé et al., 2007). Ce type d'évènement étant temporellement découplé des « blooms » zooplanctoniques, le phytoplancton (dominé par des diatomées) finit par sédimenter et par servir de nutriment au benthos (Tortajada et al., 2012) expliquant une présence non négligeable dans les sédiments. Ces floraisons hivernales peuvent de plus avoir un impact sur les stocks de nutriments

de la lagune, et influencer en conséquence l'intensité des floraisons printanières (Glé et al., 2008) dont sont tributaires les organismes filtreurs tels que les huîtres (apports nutritifs nécessaires à la gamétogenèse).

En résumé, l'écologie du Bassin d'Arcachon comme au niveau de toute zone côtière riche écologiquement, est complexe. Elle comprend les interactions entre divers compartiments biotiques (plancton, filtreurs, zostères, etc...) et abiotiques (sédiments, colonne d'eau, particule...) illustrées par la Figure 5. Ces compartiments sont impactés par des facteurs liés au climat (température, luminosité) comme à la chimie du milieu (nutriments, oxygène, pH, contaminants...).

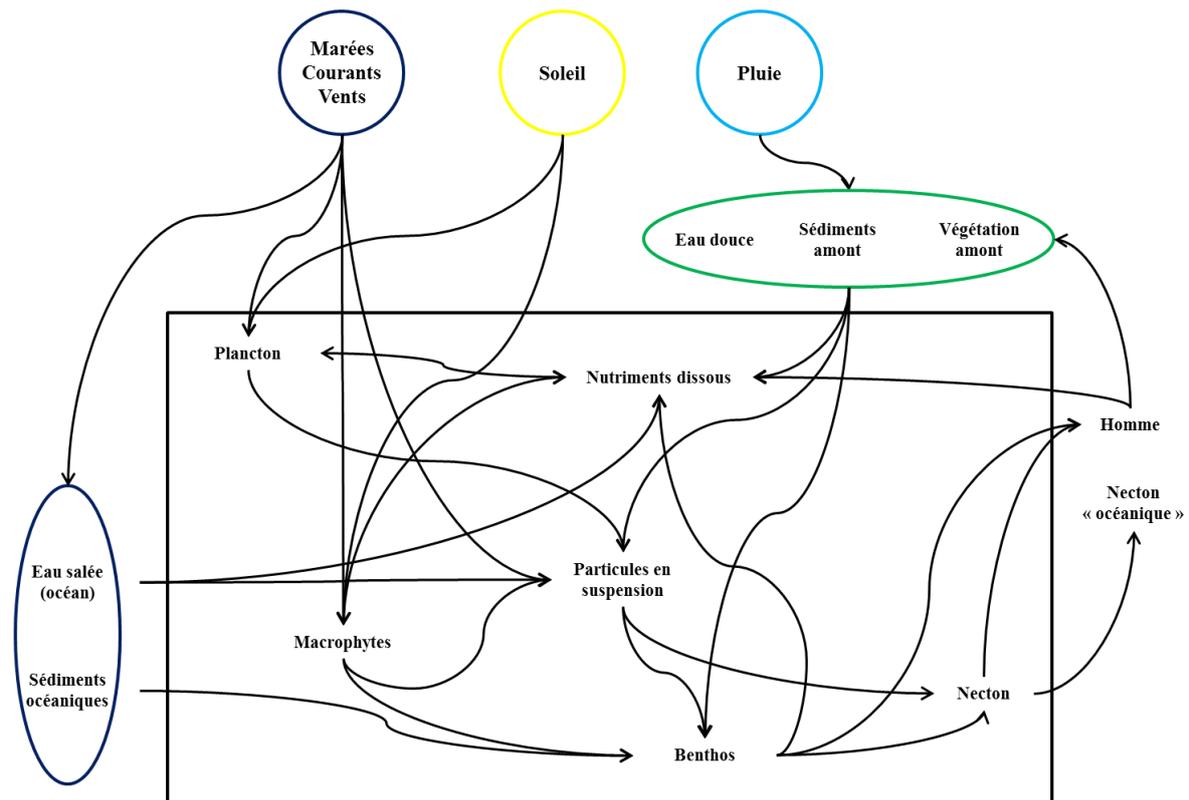


Figure 5 : Représentation schématique du fonctionnement interne d'une lagune semi-fermée (adapté de Lasserre, 1979).

Il est donc naturel que l'anthropisation du bassin versant de la lagune soit un facteur à prendre en compte lors d'approches écologiques sur le bassin d'Arcachon puisque ce paramètre est susceptible de modifier la chimie des eaux. La fragilité de cet écosystème confronté à la pression anthropique croissante qu'il subit, a donc mené les gestionnaires à prendre des mesures de protection.

1.3. Protection et surveillance

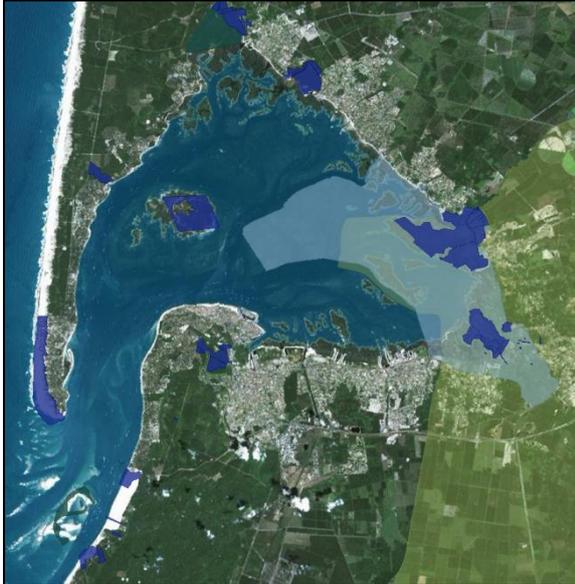


Figure 6 : Espaces protégés du bassin d'Arcachon

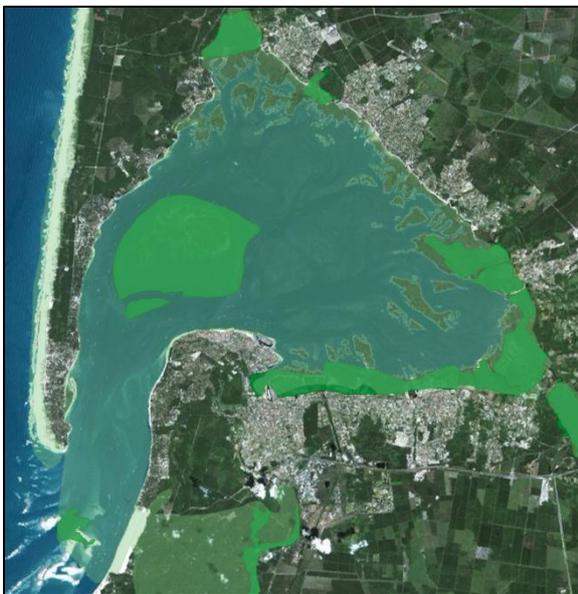


Figure 7 : Zones Naturelles d'Intérêt Ecologique Faunistique et Floristique¹ du bassin d'Arcachon

La Figure 6 représente les grands types d'espaces protégés du bassin d'Arcachon. En jaune figurent les parcs naturels régionaux. En bleu foncé apparaissent les zones du conservatoire du littoral (sauvegarde des espaces côtiers et lacustres). La zone bleue claire identifie une zone Ramsar (convention intergouvernementale de protection des zones humides d'intérêt international par les états membres). Le banc d'Arguin situé à l'entrée du bassin est le seul à appartenir aux réserves naturelles nationales. Il a été classé le 4 août 1972 et représente un lieu privilégié pour la nidification d'oiseaux protégés. Enfin la Figure 7 permet de localiser les ZNIEFF de classe I (vert foncé comme l'Île aux oiseaux) et les ZNIEFF de classe II (totalité du bassin). Ces zones indiquent un intérêt biologique et écologique majeur au niveau de sites a priori bien conservés. Les classe I présentent un intérêt « supérieur » au niveau écologique. On notera également que la totalité du bassin est classé par le réseau NATURA 2000 sous la directive « Oiseaux » et sous la directive « Habitats ».

Cartes interactives issues du site du Museum National d'Histoire Naturelle – Inventaire national du Patrimoine naturel (<http://inpn.mnhn.fr> consulté le 07/11/13)

La protection du bassin d'Arcachon a par ailleurs été complétée en octobre 2013 par la création d'un **Parc Naturel Marin** (PNM). Cet outil de gestion a pour objectif l'amélioration des connaissances du milieu, la protection de l'écosystème et le développement durable des activités liées à la mer (<http://www.aires-marines.fr>).

La lagune fait également l'objet d'un suivi physico-chimique par le réseau national du **SOMLIT** (Service d'Observation du Milieu LITtoral - <http://somalit.epoc.u-bordeaux1.fr/fr/>). Trois stations d'étude sont ainsi surveillées : Eyrac (jetée au niveau de la ville d'Arcachon), Bouée 13 (au niveau des passes extérieures du bassin) et Comprian (dans la zone interne est du bassin). Les informations

¹ ZNIEFF : Ces zones ont été inventoriées à l'initiative du ministère de l'environnement en 1982 afin de décrire des secteurs à forte capacité biologique et un bon état de conservation écologique.

fournies par ce réseau permettent un suivi long terme (température, oxymétrie, pH, matières en suspensions, chlorophylle a, nitrates, nitrites etc...) et l'extraction de tendances saisonnières et interannuelles utiles pour comprendre l'évolution de l'hydrosystème face à des problématiques de changement global.

Un réseau récent et d'importance mis en place en 2010 est le **REPAR** (REseau de Surveillance des Pesticides sur le Bassin d'ARcachon). De nombreux acteurs sont regroupés dans ce réseau : Ifremer, Agence de l'eau, Irstea, Ministère de l'agriculture, Université Bordeaux 1 et Syndicat Intercommunal du Bassin d'Arcachon (SIBA). Son objectif est la surveillance qualitative et quantitative de la dynamique de cette classe de polluant dans la lagune. REPAR a un rôle dans l'acquisition de connaissance, mais aussi dans l'information des collectivités.

Cette lagune fait également l'objet de suivis relevant du domaine de la surveillance, gérés par l'IFREMER tels que :

ROCCH : Réseau d'Observation de la Contamination Chimique. Il succède au RNO (Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin 1974 – 2008). Il permet de suivre la contamination en métaux dans les mollusques du littoral (huîtres et moules). Les métaux concernés sont réglementés au niveau européen : Cd (5 µg/g, ps), Hg (2,5 µg/g, ps), Pb (7,5 µg/g, ps), mais d'autres métaux non réglementés sont dosés à l'initiative de l'IFREMER (Zn, Cu, Ag, Ni, Cr).

Site internet : http://envlit.ifremer.fr/surveillance/contaminants_chimiques

REMI : Réseau de contrôle microbiologique. Il intègre depuis 1989 une surveillance microbiologique (*Escherichia coli*) des mollusques au niveau des zones de production conchylicole classées.

Site internet : http://envlit.ifremer.fr/surveillance/microbiologie_sanitaire

REPHY : Réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines. Créé en 1984, ce réseau comprend un suivi physico-chimique du milieu (température, salinité, turbidité, oxygène, nutriments) et un suivi spatio-temporel des flores phytoplanctoniques (chlorophylle a, *Dynophysis*, *Pseudo-nitzshia*, *Alexandrium*) et des phénomènes phycotoxiques associés (Diarrhetic Shellfish Poisoning, Amnesic Shellfish Poisoning, Paralytic Shellfish Poisoning).

Site internet : http://envlit.ifremer.fr/surveillance/phytoplancton_phycotoxines

REBENT : Réseau benthique. Instauré en 2003, il permet le suivi de la faune et de la flore benthique.

Site internet : http://envlit.ifremer.fr/surveillance/flore_et_faune_benthiques

RESCO : Réseau d'observation conchylicole. Depuis 2009, ce réseau remplace le **REMORA** (1993) et enregistre les performances de survie (taux de mortalités), de croissance (masse) et de maturation chez *Crassostrea gigas* au stade adulte (18 mois) ou de naissain de captage. Les mesures sont faites au niveau du site du Tès dans le bassin d'Arcachon.

Site internet : http://wwz.ifremer.fr/observatoire_conchylicole

REPAMO : Réseau de pathologie des mollusques. Depuis 1992, ce réseau permet de surveiller l'occurrence de certains parasites dans les mollusques du littoral (ex : *Bonamia ostreae*, *Marteilia refringens*) et les épisodes de hausses de mortalité déclarées par les professionnels (protocole II).

Site internet : <http://wwz.ifremer.fr/repamo>

VelyGer : Observer, Analyser et Gérer la variabilité de la reproduction et du recrutement de l'huître creuse en France. Depuis 2008, ce réseau est piloté au niveau national et permet le suivi de la reproduction de l'huître creuse en mesurant les paramètres associés de température, phytoplancton, maturation des huîtres, suivi des stades larvaires (cohorte) et recrutement (captage) sur collecteurs.

Site internet : <http://wwz.ifremer.fr/velyger>

ARCHYD : Réseau hydrologique du bassin d'Arcachon. Il permet le suivi hebdomadaire de différents paramètres physiques et chimiques (température, salinité, matières en suspension, silicate, nitrate, ammonium, phosphate, chlorophylle a, phéopigments) au niveau de plusieurs stations de la lagune.

Site internet : http://envlit.ifremer.fr/surveillance/reseaux_regionaux/archyd

1.4. L'ostréiculture dans le bassin d'Arcachon

1.4.1. Généralités et éléments historiques

L'ostréiculture est la culture de l'huître et représente la principale activité conchylicole en France avec 82800 tonnes d'huîtres produites en 2010-2011 (environ 54% de la production conchylicole annuelle). C'est une activité ancienne qui a succédé à la cueillette traditionnelle de l'huître indigène *Ostra edulis* (l'huître plate) sur les bancs naturels du littoral. La raréfaction de la ressource dès le XIX^{ème} siècle a conduit le naturaliste Jean Coste (1807 – 1873) à concevoir une technique ostréicole complète mise en pratique dans le Bassin d'Arcachon qui lui vaudra le titre de « berceau de l'ostréiculture française » (Bouchet et al., 1997a).

Jean Coste s'inspira de pratiques observées en Italie où l'exploitation ostréicole datait déjà de la Rome ancienne. Il conseilla donc à l'époque la mise en place des premiers collecteurs de naissain afin de les transporter ultérieurement dans des zones favorables à la croissance des organismes (Boury, 1954). Le succès de cette entreprise initia un véritable essor pour l'activité ostréicole qui commença à s'intensifier.

Dès 1868 cependant l'huître plate coexiste avec l'huître portugaise *Crassostrea angulata* introduite accidentellement dans l'estuaire de la Gironde. La culture de cette nouvelle espèce s'intensifiera durant les cinquante années suivantes à la faveur du déclin de l'huître plate qui dès l'été 1920 présente d'importantes mortalités.

L'ostréiculture française traversera cependant une crise vers la fin des années 60 liée à trois épizooties successives (Bouchet et al., 1997a) : (1) la « maladie des branchies » en 1868 liée à une nécrose de l'appareil branchial d'origine virale chez *Crassostrea angulata* ; (2) l'épizootie fulgurante de 1970 à 1973 de *Crassostrea angulata* liée à la présence d'un iridovirus (lésions cytoplasmiques) ; (3)

l'épizootie liée aux parasites *Bonamia ostreae* (bonamiose) et *Marteilia refringens* (Lallias et al., 2008) qui touche *Ostrea edulis*.

C'est à cette période que l'huître japonaise (*Crassostrea gigas*) est introduite dans le bassin d'Arcachon à titre expérimental (1969) pour devenir par la suite l'espèce principalement cultivée (Figure 5). La production d'huîtres au niveau national prend ainsi un nouvel essor et dépassera les 100000 tonnes en 1979 après être tombée à 20000 tonnes en 1971.

Le bassin d'Arcachon présente cependant les signes d'une nouvelle crise localement, alors que la production semble relancée au niveau national. Des anomalies de croissance liées à un chambrage des coquilles (structure feuilletée, altérations morphologiques) sont observées dès 1974 et sont rapidement associées à l'utilisation de peintures antisalissures enrichies en tributylétain (TBT) pour la protection des carènes des bateaux (Alzieu et Heral, 1984). Les effets de ce contaminant ont également été identifiés à des niveaux faibles de l'ordre du ng/L sur le développement larvaire de l'huître et la reproduction du nanoplancton dont les larves se nourrissent (Alzieu, 2000a). Les mesures règlementaires successives permettront finalement le retour à des conditions d'exploitation normales.

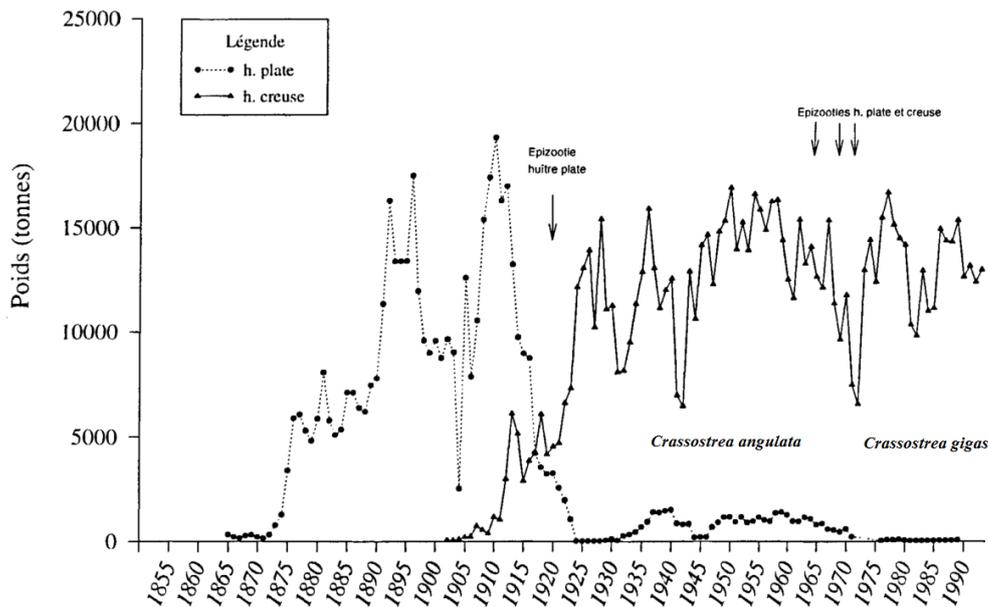


Figure 8 : Chronologie de la production ostréicole dans le bassin d'Arcachon (adapté de Bouchet et al., 1997a)

1.4.2. Les mortalités estivales

1.4.2.1. Histoire

Ce phénomène est identifié dans le bassin d'Arcachon depuis l'introduction de *Crassostrea gigas* et a été particulièrement constaté de 1981 à 1983, parfois associé à des défauts de captages. L'étude réalisée par Maurer et Comps en 1986 (Maurer et Comps, 1986) décrit déjà les caractéristiques de ces évènements : (1) les jeunes huîtres sont principalement affectées (1 an et 2 ans secondairement) ; (2) les mortalités ont lieu durant une partie de la période de reproduction ; (3) les mortalités ne semblent

pas se produire en suivant une logique de propagation. Ce phénomène avait déjà été décrit depuis plusieurs décennies au Japon et aux Etats-Unis (Soletchnik et al., 2007).

Les travaux menés par Maurer et Comps ont permis de mettre en évidence chez des huîtres d'un an des mortalités cohérentes avec les études précédentes allant jusqu'à 30% dans le « fond de bassin » au niveau de Taussat contre seulement 3% au niveau du site du Cap Ferret. Il a ainsi été montré que les mortalités affectaient principalement des individus préalablement affaiblis par la reproduction (taux de glycogène bas) et en situation de stress (fortes températures, surtout en fond de bassin). De tels évènements de « mortalités anormales » ou « sévères » ont également été observés en 1976, 1977, 1988 et 1993 dans le bassin de Marennes-Oléron, mais aussi en Normandie en 2001 (Soletchnik et al., 2007). Ces évènements se sont globalisés et ont été suivis par le réseau REMORA, mettant en évidence une variabilité temporelle et spatiale forte sur tout le territoire français comme l'indique la Figure 9 tirée des travaux de Soletchnik (Soletchnik et al., 2007).

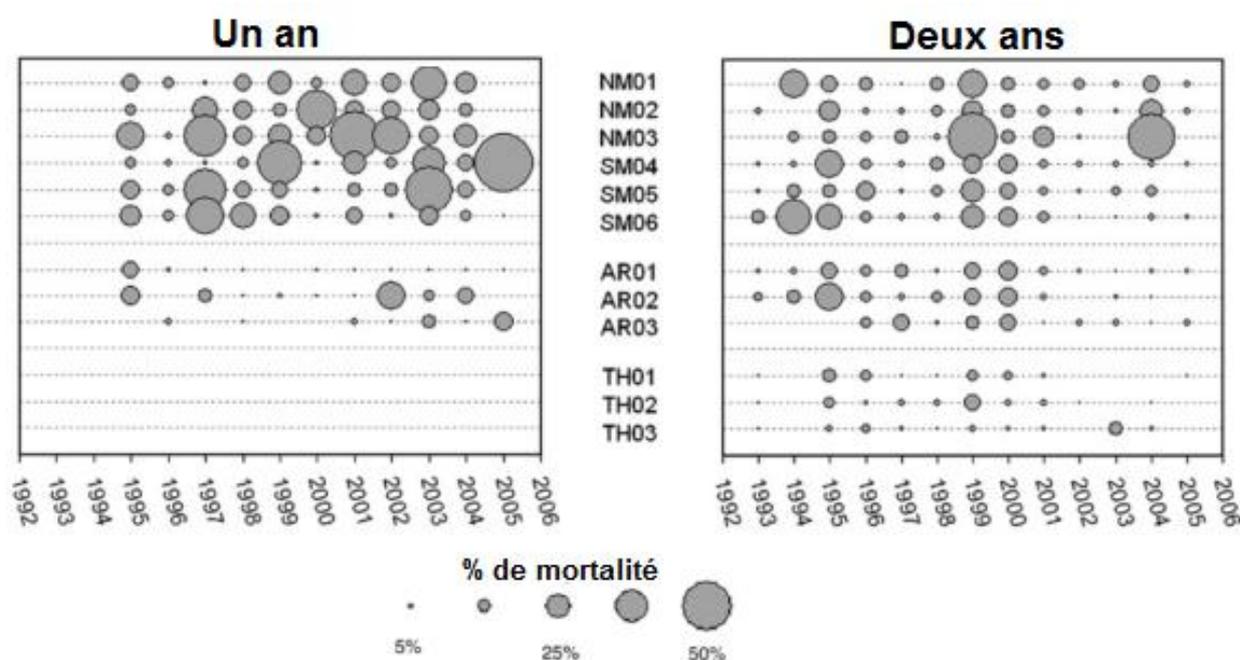


Figure 9 : Mortalités estivales enregistrées en France entre 1992 et 2006 (adaptée de Soletchnik et al., 2007)
NM et SM correspondent aux parties Nord et Sud du bassin de Marennes-Oléron ; AR au bassin d’Arcachon ; TH à l’étang de Thau. Les chiffres indiquent les différentes stations étudiées pour chaque hydrosystème.

1.4.2.2. Identification des causes

Les mortalités estivales ont depuis les années 80 fait l'objet de nombreux travaux de recherche, et ont été à l'origine de la mise en place du projet MOREST (Mortalités Estivales) de l'IFREMER entre 2000 et 2006. Les résultats de ces études indiquent que le risque d'occurrence de ces phénomènes augmente lors d'un concours de circonstances impliquant d'après Jean-François Samain (Samain, 2011): (1) une température supérieure à 19°C ; (2) une activité de reproduction intense conditionnée par (3) des apports nutritifs importants, eux-mêmes conditionnés par (4) des apports en nutriments dissous issu du lessivage des bassins versants (pluviométrie) ; (5) un stress supplémentaire (dégradation matière organique et anoxie, contaminants chimiques...) est susceptible ainsi d'affaiblir l'huître et de la rendre vulnérable à (6) des agents pathogènes opportunistes (bactéries *Vibrio*

splendidus, *Vibrio aestuarianus* ou herpès virus OsHV-1) face auxquels l'huître répondra en fonction de (7) ses capacités génétiques de défense (Figure 10).

Une étude bibliographique a par ailleurs mené l'auteur à présenter le rôle des espèces radicalaires de l'oxygène (EROs) dans l'avènement de ces mortalités, en se basant sur la théorie « germ-soma » de Heininger (Heininger, 2002). Brièvement, les EROs sont produites principalement comme sous-produits du métabolisme mitochondrial. A des températures élevées et en période de reproduction, le taux de filtration des huîtres augmente, à l'instar de la demande énergétique, afin de faire face aux besoins liés à la gamétogenèse. Ces conditions accélèrent le métabolisme mitochondrial et la production d'EROs associée, qui peut être par ailleurs aggravée en cas de contamination chimique. Des huîtres dites « sensibles » aux mortalités estivales, présentent en effet un investissement énergétique pour la reproduction très important avec plusieurs pontes partielles (stratégie « r ») et des capacités antioxydantes faibles. En comparaison les individus dits « résistants » présentent à l'inverse une surface de gonade plus faible (Huvet et al., 2010), une défense antioxydante supérieure (Fleury et al., 2010; Samain et al., 2007) et une capacité de modulation des signaux de réponse immunitaire plus élevée (Fleury et Huvet, 2012). Ces animaux privilégient la survie à la reproduction, ce qui évoque les caractéristiques des « stratégies K ».

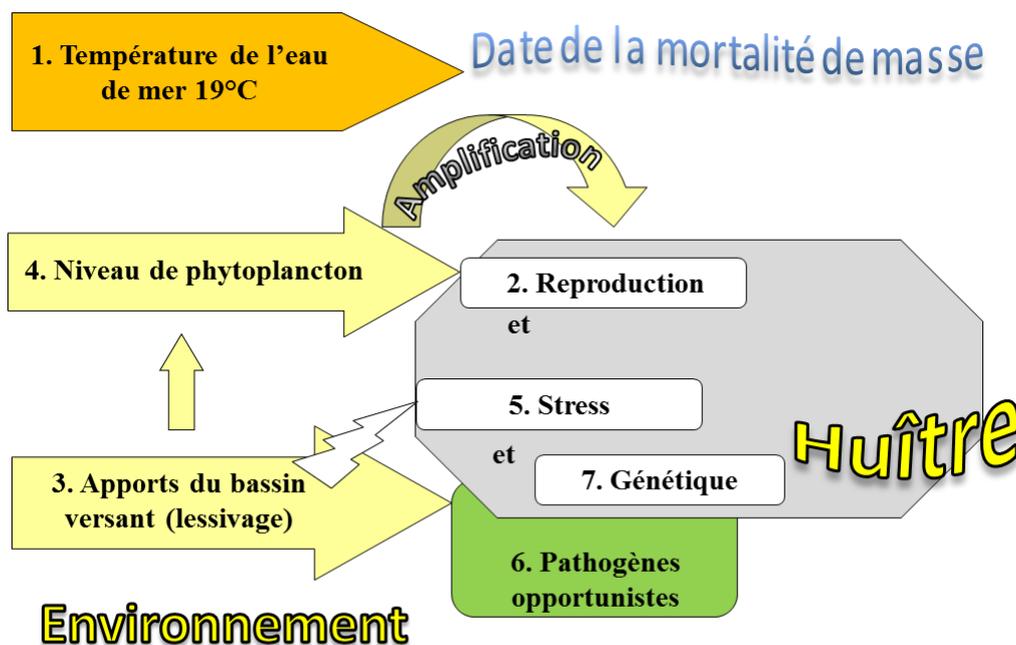


Figure 10 : Schéma des interactions entre l'huître et son milieu pouvant mener à des mortalités (adapté de Samain, 2011)

1.4.2.3. Les surmortalités

Le réseau REMORA depuis 1995, a permis au niveau national d'évaluer les mortalités entre 1995 et 2007 aux alentours de 15% (Ifremer, 2012). A partir de 2008 cependant, le phénomène s'est modifié et aggravé, avec des épisodes de « surmortalités » marquant le début d'une nouvelle crise pour la filière ostréicole ; le réseau RESCO a donc été créé. Ces épisodes concernent principalement le naissain (< 1

an), avec des taux de mortalités de 63% au niveau national en 2011 par exemple (Ifremer, 2012). A l'inverse, les huîtres de 18 mois transplantées simultanément au niveau des sites d'étude du RESCO semblent épargnées par l'ampleur du phénomène. Ces surmortalités se distinguent du syndrome des mortalités estivales mentionné précédemment. Le seuil thermique d'occurrence semble inférieur à 19°C, et l'hypothèse d'un ou plusieurs agent(s) infectieux semble prépondérante (ex : herpès-virus OsHV-1) ; l'infection et les effets de l'infection sont susceptibles d'être potentialisés par certains facteurs environnementaux (ressource trophique, qualité chimique du milieu, hydrodynamisme) et par le parcours zootechnique des animaux (captage naturel, éclosion, diploïde, triploïde...) (Cochenne-Laureau et al., 2010). Les données enregistrées par le RESCO, tendent à montrer une intensification du phénomène depuis 2009 et une variabilité spatiale et temporelle dans l'occurrence des événements : à Arcachon au niveau du site du Tès, ces événements sont survenus mi-mai en 2009, mi-juin en 2010 et début mai en 2011. Les deux graphiques présentés ci-dessous (Figure 11) permettent de voir le type de séries chronologiques proposés en ligne par le réseau RESCO. On observe ainsi pour l'année 2013 des taux de mortalités cumulés atteignant les 71% pour le naissain contre seulement 15% chez les huîtres de 18 mois.

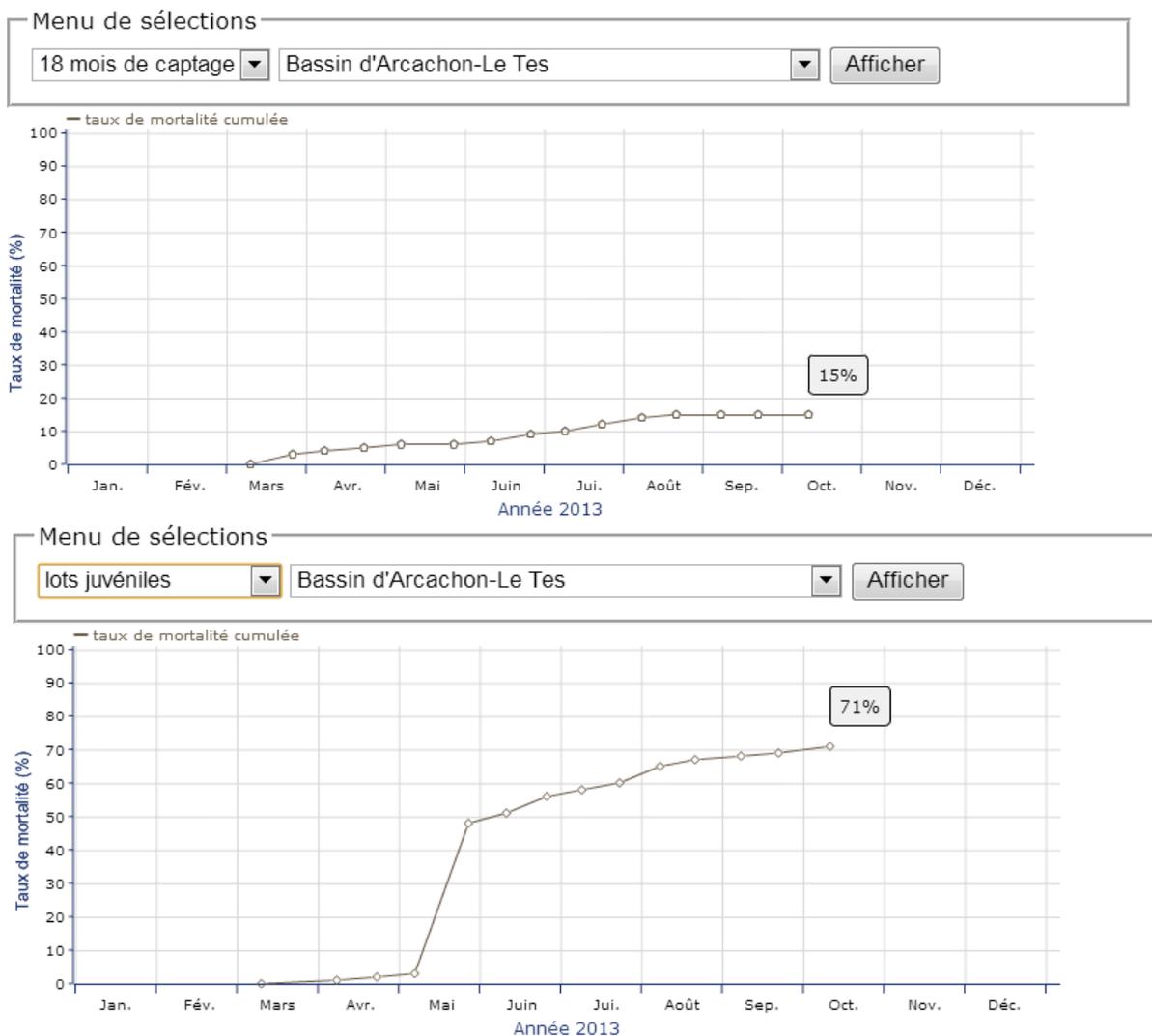


Figure 11 : Surveillance RESCO des mortalités estivales en 2013 au Tès (http://wwz.ifremer.fr/observatoire_conchylicole)

2. L'huître creuse *Crassostrea gigas*

2.1. Systématique et répartition

Crassostrea gigas (Thunberg 1793) est un mollusque bivalve dont la classification est :

Règne : *Animalia* ; embranchement : *Mollusca* ; classe : *Bivalvia* ; sous-classe : *Pteriomorphia* ;
ordre : *Ostreoida* ; super-famille : *Ostreoidea* ; famille : *Ostreidae* ; sous-famille : *Crassostreinae* ;
Genre : *Ostrea*).

Source : *World Register of Marine Species* (www.marinespecies.org)

L'huître japonaise (ou huître du Pacifique) est originaire du Japon. Ses grandes capacités d'adaptation et ses exigences écologiques peu restrictives (espèce euryèce) ont permis de l'introduire dans de nombreux pays à l'échelle globale. Cela a permis d'implanter l'ostréiculture là où elle n'était pas pratiquée (Figure 12) ou de remplacer des stocks affectés par des maladies afin de redynamiser la production (ex : France en 1969).

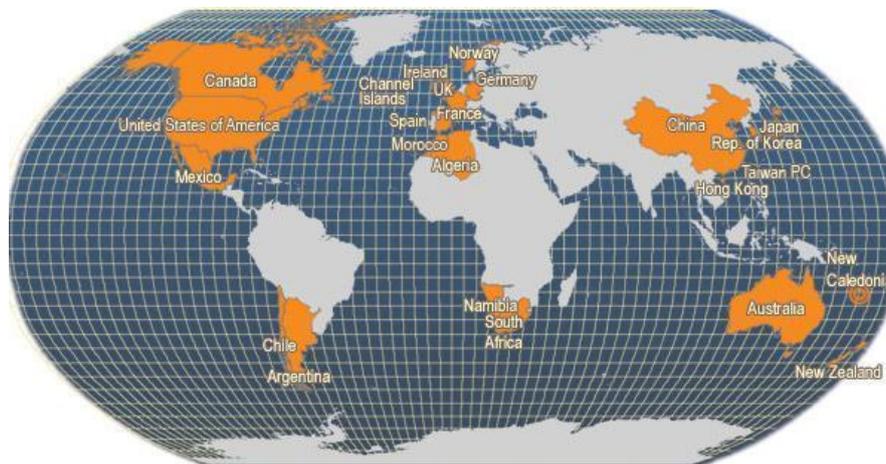


Figure 12 : Principaux pays producteurs d'huître japonaise (source : www.fao.org)

2.1. Ecologie

L'huître japonaise est une espèce sessile benthique colonisant les substrats durs (rochers ou autres huîtres) des zones intertidales comme subtidales (jusqu'à 40 m). C'est un organisme poïkilotherme (température interne non régulée et identique à celle du milieu) présentant une grande tolérance face aux variations thermiques (eurytherme) ou de salinité (euryhaline) (Miossec et al., 2009). Ces caractéristiques expliquent sa présence dans des zones estuariennes présentant des salinités de 15 psu et dans des zones océaniques plus salées (35 psu). Son optimum de salinité est cependant situé autour de 20-25 psu et son optimum thermique autour de 15-25°C.

Crassostrea gigas étant cultivée essentiellement en milieu ouvert, et son mode de reproduction étant externe, il est logique de la retrouver à l'état sauvage. Dans le bassin d'Arcachon, cet organisme peut former de véritables récifs, faisant d'elle une véritable espèce « ingénieur de l'écosystème » puisque sa

présence va structurer physiquement le milieu de vie et l'accès à certaines ressources pour d'autres espèces (Salvo, 2010).

Ses importantes capacités de colonisation lui ont permis de se répandre rapidement dans certaines régions comme en Europe du Nord où elle perturbe d'autres activités aquacoles voire cause des problèmes en se fixant dans les systèmes de refroidissement de certaines centrales électriques. On la retrouve ainsi classée avec les espèces invasives d'après la base de données globale des espèces invasives (GISD – Invasive Species Specialist Group, 2005).

2.2. Anatomie et biologie générale

Crassostrea gigas possède une coquille inequivalve formée d'une valve gauche (inférieure) très creuse par laquelle l'organisme se fixe au substrat et d'une valve droite (supérieure) plate légèrement convexe. Les deux valves sont rattachées par un ligament charnière au niveau du crochet. L'aspect général de la coquille est irrégulier et la forme (longueur, hauteur, largeur) s'adapte aux pressions de l'environnement telles que la densité d'individus (Troost, 2010).

Cette coquille sert à protéger le corps mou de l'organisme, et se compose à la base d'une matrice à la fois protéique et calcique sécrétée par le manteau. Cet organe présente deux lobes qui couvrent la totalité de l'organisme, hormis en face ventrale où une ouverture entre la cavité palléale et l'extérieur est aménagée pour permettre les échanges avec le milieu. L'ouverture et la fermeture des valves pour la respiration et la nutrition sont contrôlées par un muscle adducteur dont l'empreinte est visible dans la coquille (Levine et al., 2012).

Le système circulatoire de l'huître est ouvert : la circulation de l'hémolymphe (fluide circulatoire) à travers l'organisme est assurée par l'action d'un cœur musculaire situé entre le rectum et le muscle adducteur (Figure 13). Ce cœur présente un ventricule et deux oreillettes. Il expulse l'hémolymphe par le ventricule et la récupère par des sinus. L'hémolymphe ne possède pas de pigment respiratoire chez l'huître et baigne les organes pour que l'oxygène dissout diffuse directement dans les cellules. On y trouve également les hémocytes, cellules de la défense immunitaire impliquées entre autres dans la phagocytose d'agents pathogènes (Levine et al., 2012). L'huître ne possède pas de système nerveux central, mais présente des ganglions nerveux.

La respiration chez les bivalves est réalisée par l'intermédiaire des branchies qui séparent la cavité palléale en deux dans le cas de l'huître. Ces organes lamellaires (4 feuillets) prélèvent l'oxygène de l'eau de mer mais servent également à filtrer les particules en suspension grâce au mucus dont elles sont couvertes (Miossec et al., 2009). L'huître est un organisme filtreur suspensivore, ce qui signifie que ces particules peuvent être nutritives (ex : phytoplancton, bactéries) et acheminées vers la bouche par des battements ciliaires ou non nutritives et agglomérées puis excrétées sous-forme de pseudo-fécès (tri réalisé au niveau des palpes labiaux).

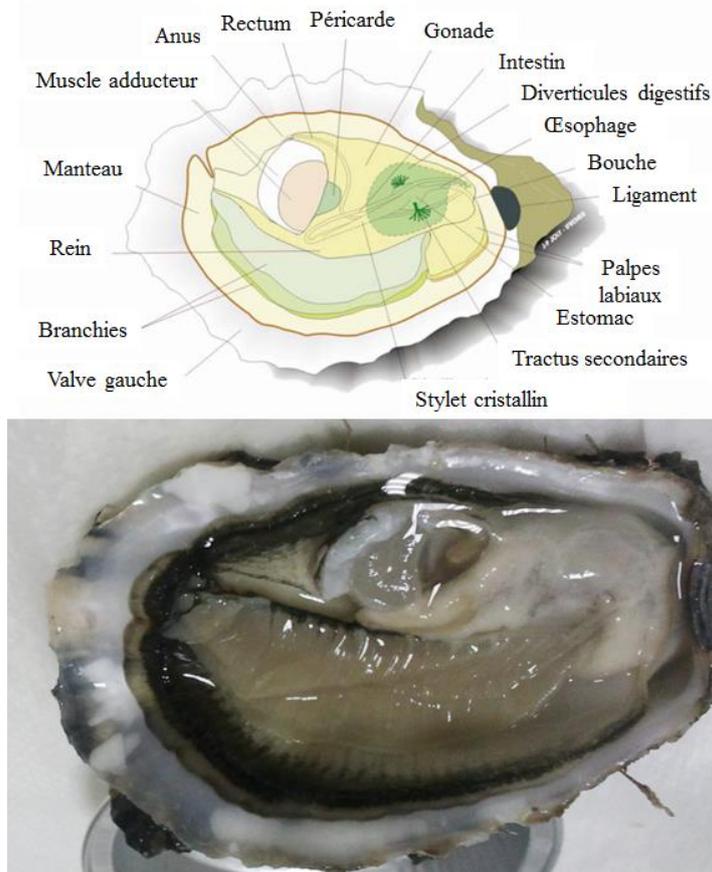


Figure 13 : Schéma et photo de l'anatomie de *Crassostrea gigas* (source : Miossec et al., 2009)
Illustration : J.-P. Joly (IFREMER)

2.3. Reproduction

L'huître japonaise est un animal fonctionnellement dioïque présentant un hermaphrodisme alterné protandre. Cela signifie que le premier cycle sexuel de ces organismes est un cycle mâle. L'hermaphrodisme se manifeste par la suite par un changement de sexe d'une saison de reproduction à l'autre selon des mécanismes encore peu clairs (Levine et al., 2012). Des cas d'hermaphrodisme (mâle et femelle simultanément) sont observables de façon marginale. Aucun dimorphisme clair ne permet de différencier les mâles des femelles sans observation microscopique. La fécondation est externe, c'est-à-dire que les gamètes sont émis dans le milieu et que le zygote est formé dans l'eau de mer. La larve pélagique nageuse (ou veligère) se développe alors durant une vingtaine de jours en se nourrissant de phytoplancton et de bactéries de petites tailles, jusqu'à atteindre le stade de « larve en fixation » (Troost, 2010).

Le cycle de reproduction de l'huître creuse (Figure 14) présente une place centrale dans la vie de l'organisme et oriente une grande partie des ressources énergétiques. Après une période de repos hivernal (températures basses, absence de nourriture), la croissance des huîtres reprend à la faveur d'une hausse des températures et d'une augmentation de la ressource trophique (floraisons printanières). La gamétogenèse (production des gamètes) débute à cette période et se caractérise par une accumulation de glucides (pic en mai) progressivement transformés en lipides (pic en juin) pour

les réserves énergétiques des cellules gamétiques. L'effort de reproduction dépend grandement de la qualité et de la quantité de la nourriture pendant la période printanière. La température est un paramètre important puisqu'il contribue à la vitesse de maturation et au déclenchement des émissions gamétiques (ou « pontes », frai) qui ont lieu entre mi-juin et mi-septembre (Perrière-Rumèbe, 2012).

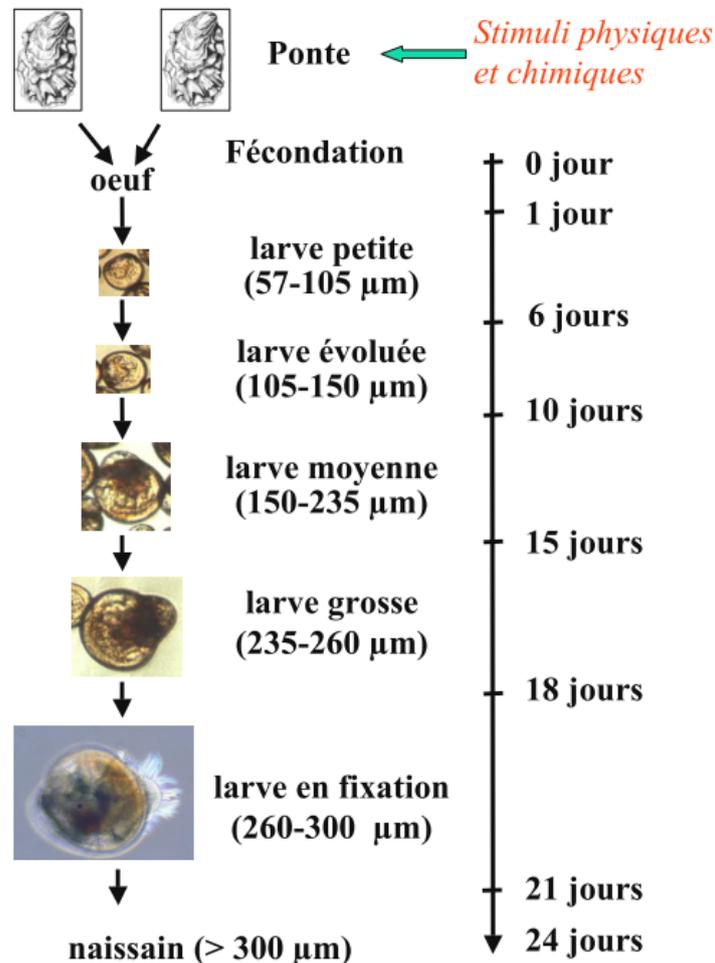


Figure 14 : Développement de *C. gigas* après fécondation (Perrière-Rumèbe, 2012) pour une température de 22 à 24°C

2.4. Utilisation en écotoxicologie

Les organismes bivalves et filtreurs ont toujours présenté un grand intérêt en écotoxicologie (Zhou et al., 2008). Leurs modes de nutrition et de respiration associés à leur immobilité, permet en effet à ces organismes d'intégrer les variations de leur milieu à la fois au niveau de la colonne d'eau, mais également du sédiment puisqu'ils sont benthiques (épibenthique dans le cas de l'huître).

Son statut d'espèce consommée présente par ailleurs un intérêt en termes de santé publique. Certains travaux ont déjà montré que *C. gigas* présentait des capacités de bioaccumulation des contaminants métalliques supérieures à d'autres mollusques (Baudrimont et al., 2005). La résistance naturelle de cet organisme au stress de manière général est également un paramètre intéressant permettant d'étudier l'effet de contaminants à des niveaux subléthaux assez élevés sans risquer de tuer l'animal. La répartition globale de cette espèce permet également d'envisager des comparaisons avec d'autres sites. Le Tableau 1 présente quelques exemples illustrant l'emploi de *C. gigas* en écotoxicologie.

Tableau 1 : Quelques exemples d'approches expérimentales en écotoxicologie avec *Crassostrea gigas*

Polluant	Organe	Dose	Stade	Biomarqueur	Effet	Référence
Cadmium	Br. / Gd.	0,01 – 0,1 ppm	1 an	ARN de <i>hsp90</i> et <i>mt</i>	+	(Choi et al., 2008)
	Hém.			Activité aspartate et alanine aminotransférase	+	
Zinc	Br. / Gd.	10,2 mg/L	3 ans	ARN <i>mt</i>	+	(Mottin et al., 2012)
Pesticides cocktail	Hém.	4,55 µg/L	adultes	Phagocytose	-	(Gagnaire et al., 2007)
				ARN de 19 gènes	-	
Pesticides cocktail	M. / Gd.	17 µg/L	adultes	Protéines HSP et MT ARN <i>ferritin</i> , <i>NifU</i> , <i>ribosomal protein P2-like</i>	/	(Collin et al., 2010)
Cadmium	Br.	0,01 – 0,1 ppm	1 an	ARN <i>sodmt</i>	+	(Park et al., 2009)
	Hém.			Activités glutamate oxaloacetate et pyruvate transaminase	+	
Tributylétain	Br.	5 – 20 ppb	1 an	ARN <i>sodmt</i>	+	(Park et al., 2009)
	Hém.			Activités glutamate oxaloacetate et pyruvate transaminase	+	
Cadmium	Br. / Gd.	4 µM	adultes	Protéines HSP et MT	+	(Moraga et al., 2005)
Cuivre		0,2 + 0,2 µM			+	
Cd + Cu					+	
Cadmium	Br	0,13 µM	1 an (2n et 3n)	ARN <i>coxI</i>	+	(Achard-Joris et al., 2006)
Zinc		15,3 µM			/	
Cd + Zn		0,13 + 15,3 µM			+	
Cadmium	Br	15 µg/L	1 an (2n et 3n)	ARN <i>mt1</i> et <i>mt2</i>	+	(Marie et al., 2006b)
Zinc		1 mg/L		/		
Cd + Zn		15 µg/L + 1 mg/L		+		
Argent	Br.	20 µg/L			+	
Cadmium	Br. / Gd.	200 µg/L			+ / +	(Géret et al., 2002)
Cuivre	Br.	40 µg/L		Protéines MT	+	
Mercure	Br. / Gd.	20 µg/L			+ / +	
Zinc	Br	1 mg/L			+	
Fluorène	Hém.	10 ⁻⁹ mg/mL	adultes	Phagocytose	-	(Bado-Nilles et al., 2008)
Pyrène					-	
Diuron	Hém.	0,3 – 3 µg/L	3 ans	Paramètres hématocytaires (phagocytose, granulocytes...)	+	(Bouilly et al., 2007)
HAP (mix fraction fioul soluble)	Gd.	0,1% volume			+	(Boutet et al., 2004a)
Atrazine + Diuron + Isoproturon	Gd. / Br.	2 + 0,5 + 1 µg/L	adultes	ARN <i>gst</i>	+ / -	
Glyphosate	Gd. / Br.	2 µg/L			+ / -	
Benzo[a]pyrène	/	0,2 nM – 2 µM	embryons	Test comète + larves D anormales + 8-oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosine	+	(Wessel et al., 2007)
17α-éthinyloestradiol	/	0,02 – 1,7 nM		Test comète + larves D anormales	/	
endosulfan	/	0,5 – 500 nM			+	
Atrazine + Diuron + Isoproturon	Gd. / Br.	2 + 1 + 0,5 µg/L	adultes	Expression différentielle de 137 gènes (hybridation soustractive)		(Tanguy et al., 2005)
Glyphosate		2 µg/L				

Br. : branchies ; Gd. : glande digestive ; Hém. : hémolymph

3. Contamination chimique et stress oxydant

L'objectif principal de cette étude est l'acquisition de connaissances concernant la dynamique et les effets des contaminants présents dans le Bassin d'Arcachon sur la biologie de l'huître japonaise. Ces travaux sont donc basés sur un « screening » assez large des différents compartiments de la lagune (biota, sédiments, eau, particule) permettant de détecter un maximum de composés différents. Cette section s'attardera donc sur la présentation des contaminants retrouvés dans le bassin d'Arcachon. Une attention particulière sera accordée aux composés employés durant nos approches expérimentales et sur la notion de stress oxydant qui représente une des conséquences majeures d'une contamination chimique chez les organismes aquatiques.

3.1. Le stress oxydant

La notion de stress oxydant est liée à la présence dans la cellule de composés réactifs : les radicaux libres. Ces composés de différentes natures sont par définitions des molécules/atomes présentant la capacité de réagir librement par l'intermédiaire d'électrons libres (Hermes-Lima, 2004). Dans ce contexte nous nous concentrerons sur les espèces radicalaires de l'oxygène (EROs). Leur action sur les composants cellulaires a été mise en lien dès les années 50 (Harman, 1956) avec l'avènement de certaines maladies et le vieillissement (« théorie du vieillissement »).

Les EROs ont depuis fait l'objet de nombreux travaux concernant leur origine et leur rôle dans la cellule. Leur production est majoritairement liée au métabolisme de l'oxygène chez les organismes aérobies (Lushchak, 2011), faisant de la mitochondrie un des principaux sites de génération de ces composés (Balaban et al., 2005). Plus précisément, le complexe III de la phosphorylation oxydative a été montré comme l'un des sites principaux de génération d'ion superoxyde (O_2^-) (Demin et al., 1998). Le complexe I semble également lié à la production d'EROs sous certaines conditions (Kushnareva et al., 2002). Globalement, 0,1 à 1% de l'oxygène consommé induit la production d'ion superoxyde (Fridovich, 2009).

Les principales EROs sont : l'ion superoxyde (O_2^-) produit entre autres par une « fuite » d'électrons au niveau de la phosphorylation oxydative, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) issu de la métabolisation de l'ion superoxyde par les superoxydes dismutases (SOD) et le radical hydroxyle (OH) hautement réactif, issu notamment des réactions de Fenton et de Haber-Weiss à partir de peroxyde d'hydrogène (Grune et al., 2013; Halliwell and Gutteridge, 1984; Kehrer, 2000).

Il apparaît que les EROs et leurs dérivés bien que potentiellement délétères pour la cellule, possèdent un rôle dans la régulation de certains processus biologiques (Lushchak, 2011). Leur inévitable production est donc régulée par un système antioxydant complexe dont le but est de préserver un équilibre entre production et dégradation (ex : SOD, GPX, CAT). Cet équilibre peut cependant être perturbé par l'action d'agents exogènes « pro-oxydants » tels que les métaux ou les xénobiotiques organiques (Regoli et Giuliani, 2013). De nombreuses voies métaboliques peuvent alors être à

l'origine d'une production accrue d'EROs (Figure 15), y compris paradoxalement certaines impliquées dans la production d'agents antioxydants.

Dans ce type de situation, ces composés hautement réactifs sont susceptibles de : (1) causer des dommages à l'ADN (cassures, oxydations des bases azotées : 8-oxoguanine), (2) modifier les protéines (polymérisation oxydative, cassures), (3) oxyder les lipides et sucres membranaires etc...(Valavanidis et al., 2006). De tels dégâts peuvent être réversibles en fonction de l'intensité du stress subi ou mener la cellule à des extrêmes tels que l'apoptose ou la nécrose (Lushchak, 2011). Le stress subi peut-être défini schématiquement de deux manières : aigu (stress fort et bref lié à une contamination ponctuelle par exemple) ou chronique (stress modéré mais pérenne lié à une contamination diffuse par exemple).

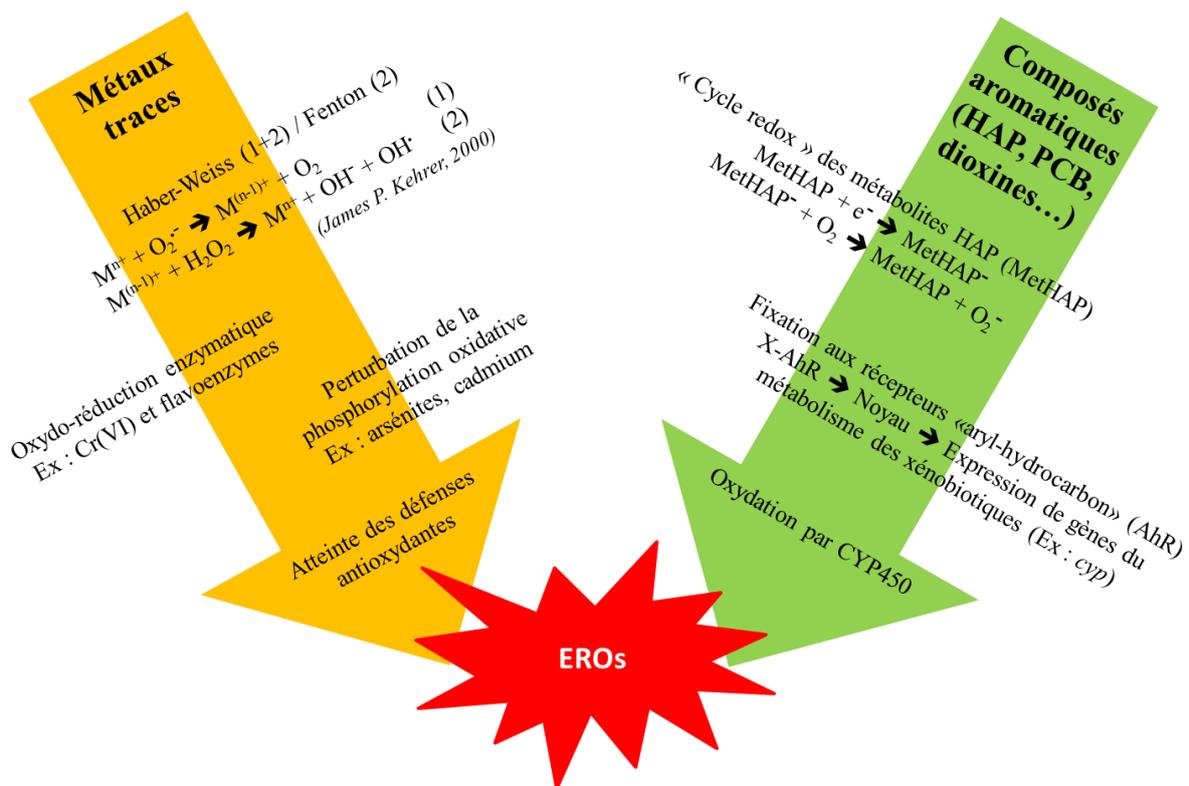


Figure 15 : Représentation schématique et simplifiée de la production d'EROs par les contaminants traditionnels (adapté de Regoli Francesco, 2012)

3.2. Les contaminants métalliques

3.2.1. Généralités

Les métaux sont étudiés depuis longtemps dans les systèmes aquatiques. Il s'agit de composés naturels dont la présence dans les écosystèmes est liée à (1) leur abondance dans la croûte terrestre et (2) aux rejets dus à l'anthropisation. Pendant longtemps le terme de « métaux lourds » a été employé pour désigner les contaminants métalliques. Ce terme n'a cependant pas de définition scientifique solide (Duffus, 2002), ce qui explique qu'on lui préfère aujourd'hui le terme « d'éléments traces métalliques » ou ETM (Rollin et Quiot, 2006).

Ces ETM peuvent être nécessaires pour le bon fonctionnement de certaines fonctions cellulaires. On désignera ces métaux comme « essentiels », pouvant être utilisés dans le cœur catalytique de nombreuses enzymes ou protéines (fer dans l'hémoglobine, cuivre ou zinc dans les superoxyde dismutases ou dans la cytochrome oxydase...). Une définition des métaux essentiels a été donnée :

“An element is considered essential to an organism when a decrease of its accumulation below a certain limit results consistently in a reduction in a physiologically important function, or when the element is an integral part of the organic structure performing a vital function in the organism.” (cité par (Mason, 2013)).

Il est toutefois important de noter que ces éléments essentiels peuvent rapidement devenir toxiques si ils sont accumulés en excès (ex : cuivre). Ils sont donc soumis à une homéostasie telle que leurs niveaux sont régulés de manière active. D'autres ETM à l'inverse ne présentent aucune fonction physiologique connue et peuvent être « simplement » toxiques pour la cellule (ex : mercure).

Trois types de mécanismes peuvent être schématiquement proposés pour décrire l'entrée des ETM dans les cellules (Mason, 2013): (1) la diffusion passive ; (2) le transport facilité et 3) le transport actif et l'endocytose (Figure 16).

- (1) La diffusion passive est le transfert du contaminant à travers la membrane phospholipidique de la cellule en suivant son gradient de concentration. Elle concerne principalement les métaux complexés sous forme neutre et dépend à la fois de l'hydrophobicité du complexe, de sa taille et de sa forme.
- (2) Le transport facilité (ou diffusion accélérée) permet l'internalisation de composés chargés qui ne pourraient pas traverser la membrane phospholipidique. Ce processus n'est pas consommateur d'énergie et se base sur l'utilisation des protéines membranaires de types canaux ou pores permettant les échanges entre le milieu extérieur et le cytosol. Bien que spécifiques à leurs substrats, la conformation des protéines impliquées peut entraîner l'internalisation d'ions/complexes métalliques proches en termes de taille/structure du substrat naturel.
- (3) Le transport actif est un mode de transfert consommateur d'énergie permettant l'internalisation d'ions métalliques « contre leur gradient de concentration » par des protéines transmembranaires de type ATPases (ex : Na^+/K^+ ATPase). Il peut s'agir de transports « uniport », « symport » ou « antiport » avec lesquels les contaminants métalliques peuvent interagir sous leur forme ionique ou complexée.

Une dernière voie d'entrée des ETM, particulièrement sous forme complexée, serait la pinocytose qui consiste en une invagination de la membrane cellulaire et la formation de microvésicules contenant « du milieu extracellulaire » (Puckett et al., 2010).

L'entrée des ETM dans la cellule est cependant un processus complexe. Elle dépend des interactions entre plusieurs paramètres à la fois biologiques (organisme, stade de développement, mode de nutrition...) et chimiques en lien avec la spéciation du contaminant ou sa forme chimique (ion libre,

complexe inorganique, complexe organique, forme particulaire). Cette spéciation est par ailleurs tributaire des conditions physico-chimique du milieu (pH, salinité, présence de particules ou de ligands organiques...).

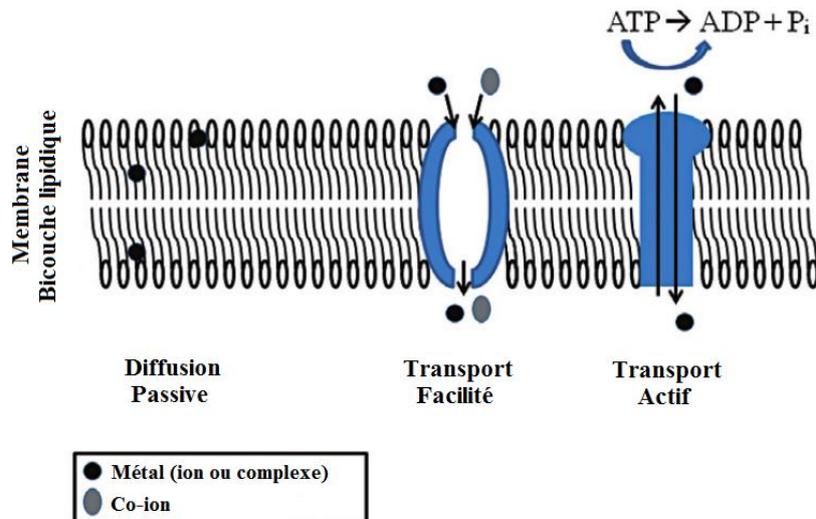


Figure 16 : Principales voies d'entrée des métaux dans la cellule (adapté de Mason, 2013)

L'outil de modélisation a donc été employé pour prédire l'entrée des ETM dans les organismes et leurs effets, en se basant sur l'interaction entre le métal et un « ligand biologique » localisé à l'interface « organisme – milieu extérieur » : c'est le « Biotic Ligand Model » (BLM). Les trois éléments centraux de ce modèle sont : (1) la chimie du milieu extérieur qui conditionne la spéciation du contaminant ; (2) la présence de ligands biologiques à l'interface « organisme – milieu extérieur » (ex : surface des branchies) et 3) la relation entre la fixation du contaminant au ligand et les effets biologiques associés (Paquin et al., 2002). Bien que ce modèle considère à la base une toxicité induite par le métal sous forme ionique, les recherches s'orientent vers la prise en compte d'effets causés par des complexes « métal – matière organique » (Paquin et al., 2002).

Les sous-sections suivantes s'intéresseront plus particulièrement aux trois métaux étudiés lors de nos approches de terrain : le cadmium (Cd), le zinc (Zn) et le cuivre (Cu).

3.2.2. Le cadmium

Ce métal (CAS : 7440-43-9) présente des abondances naturelles dans la croûte terrestre relativement faibles (1-2 µg/kg - (Bisson et al., 2011)). C'est un élément chalcophile (affinité pour le soufre) présent naturellement sous forme minérale associée au zinc (blende, sphalérite) dont il est proche en termes de structure ionique (Rollin et Quiot, 2006). On le retrouve de manière prépondérante dans les roches sédimentaires riches en carbones, sulfures et phosphates.

Le cadmium est souvent obtenu comme sous-produit de l'extraction du zinc (calcination des minerais), ce qui lui a valu un intérêt particulier dans l'étude de la contamination du continuum fluvio-estuarien Garonne-Gironde (Arini et al., 2011).

Il est principalement utilisé pour la métallisation des surfaces (cadmiage), dans la fabrication d'accumulateurs électriques (oxyde de cadmium), de pigments (chlorure, sulfate et sulfure de cadmium), de stabilisants pour matières plastiques (chlorure de cadmium) et dans certains alliages (Bisson et al., 2011).

Les principaux apports atmosphériques sont naturels (éruptions volcaniques, entraînement de particules du sol) et anthropiques (métallurgie, incinérateurs, combustion du charbon). Le lessivage des sols et des décharges industrielles et minières est à l'origine de sa présence dans les eaux où il est retrouvé sous forme cationique (Cd^{2+}) ou complexée (CdSO_4 , CdHCO_3^+ , CdCl^+ , CdCl_2) ce qui accroît sa mobilité (Rollin et Quiot, 2006).

D'après le règlement UE n°494/2011 du 20 mai 2011 (Commission Européenne, 2011a) le cadmium et l'oxyde de cadmium sont désormais classés cancérogènes de classe 1B et comme présentant pour les milieux aquatiques une toxicité aiguë et chronique de catégorie 1 (Commission Européenne, 2011a). L'utilisation de ce métal est désormais prohibée dans les équipements électriques, électroniques dans les colorations et la stabilisation de certains produits (dont le PVC) et dans les traitements de surface (Brignon et al., 2004). Face à la toxicité de ce métal, des réglementations ont été mises en place au niveau européen.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande une dose journalière provisoire (une semaine) à ne pas dépasser de 7 μg Cd/kg poids corporel (WHO and FAO, 2003). L'UE impose par ailleurs depuis 1998 (Conseil de l'Union Européenne, 1998) de ne pas dépasser 5 μg Cd/L dans les eaux destinées à la consommation humaine (recommandation OMS : 3 μg /L). En fonction de la dureté de l'eau, des PNEC (Predicted Non Effect Concentrations) de 0,21 μg Cd/L (pour une dureté inférieure à 50mg de CaCO_3 /L) et de 0,75 μg Cd/L (pour une dureté supérieure à 50mg de CaCO_3 /L) ont été déterminées pour le Cd (Bisson et al., 2011). Les Normes de Qualité Environnementale en Moyenne Annuelle pour les eaux de surfaces intérieures (NQE-MA) fixées par l'UE varient avec la dureté de l'eau également, et se répartissent de 80 ng/L à 250 ng/L (Parlement européen et Conseil de l'Union Européenne, 2008).

3.2.3. Le zinc

Le zinc (CAS : 7440-66-6) est un métal très présent dans la croûte terrestre où il abonde dans des concentrations comprises entre 70 et 132 mg/kg (Rollin et Quiot, 2006). On le retrouve sous différentes formes minérales telles que la sphalérite ou blende (sulfure dans les roches magmatiques), la smithsonite (carbonate – Zn CO_3), la calamine (silicate) et la franklinite. Il est également présent dans les minerais de plomb où il est toujours associé au cadmium (Bisson et al., 2005a).

Il est très utilisé dans nos sociétés sous différentes formes : chlorure de zinc (fonderie, soudure, agents conducteurs, synthèse de médicaments, teintures...) ; distéarate de zinc (stabilisant PVC, lubrifiant, caoutchouc, papier, textile, cosmétique...) ; oxyde de zinc (caoutchouc, verre, céramiques, médicaments...) ; phosphate de zinc (pigment anticorrosion) ; sulfate de zinc (fertilisants, pesticides, médicaments...).

Les sources d'exposition naturelles sont similaires à celles du cadmium. Trois types d'activités anthropiques sont cependant à l'origine de sa présence dans les milieux naturels (Bisson et al., 2005a) : les sources minières et industrielles (raffinage, constructions de toitures, pigments, plastiques...); les épandages agricoles (alimentation des animaux); les activités urbaines et le trafic routier (érosion des éléments riches en zinc). Ce métal présente également un intérêt dans l'étude des écosystèmes aquatiques de par son utilisation dans la confection d'anodes sacrificielles dans la fabrication des bateaux (Mottin et al., 2012).

On le retrouve dans les milieux aquatiques sous forme d'ions divalents (Zn^{2+}) ou sous-forme complexée ($ZnOH^+$, $Zn(OH)_2$, $Zn(OH)_3^-$, chlorures, sulfates...). Il peut également se fixer à la matière organique dissoute (acides fulviques, humiques) et particulaire. Sa spéciation comme celle de nombreux métaux dépend des conditions de physico-chimie du milieu (ex : pH).

Il s'agit d'un des métaux essentiels les plus importants (Salgueiro et al., 2000). Chez l'être humain, son rôle est avéré dans le fonctionnement d'environ 200 enzymes. Le zinc est notamment impliqué dans la lutte contre le stress oxydant, et des carences peuvent mener à diverses pathologies (retards de croissance, perturbation de la réponse immunitaire etc...).

Le caractère essentiel de ce métal le soumet chez la plupart des organismes à une régulation interne (homéostasie). Les concentrations rencontrées habituellement dans les eaux de boissons ne posant pas de problème toxicologiques, aucune réglementation n'a été instaurée en Europe pour le zinc. L'INERIS propose cependant, au regard des études écotoxicologiques déjà menées, une PNEC dans le compartiment aquatique de $8,6 \mu g Zn/L$ (Bisson et al., 2005a).

3.2.4. Le cuivre

Ce métal (CAS : 7440-50-8) existe à l'état natif dans la croûte terrestre dans des abondances allant de 45 à 70 mg/kg (Rollin et Quiot, 2006). Cet élément chalcophile est présent dans de très nombreux minerais associés à d'autres métaux tels que le plomb, le zinc ou le cadmium. On le retrouve également dans la malachite et sous formes de sulfures dans la chalcocite, la tétrahédrite ou l'énergite et d'oxydes dans la cuprite (Bisson et al., 2005b).

Sa conductibilité électrique et thermique fait de lui l'un des métaux les plus employés par l'Homme. Il est utilisé notamment sous-forme d'acétate de cuivre (catalyseur, pigments, fongicide, insecticide), de chlorure cuivrique (catalyseur, désodorisant, encres, raffinage des métaux...), d'oxyde cuivrique (pigments, peintures anti-salissures des bateaux, insecticide, catalyseur...), de sulfate de cuivre (« bouillie bordelaise », antiseptique, pigments...) etc...

Ses sources d'exposition naturelles sont les mêmes que celles citées précédemment. Son origine anthropique est liée à l'industrie métallurgique, l'industrie du bois, l'incinération des ordures ménagères, la combustion du charbon, la fabrication de fertilisants. Plus spécifiquement, sa présence dans l'eau dépend de l'érosion des sols par les cours d'eau et de son utilisation sous-forme de sulfate de cuivre (bouillie bordelaise).

Sa biodisponibilité pour les organismes aquatiques est tributaire de sa spéciation, et donc des conditions physico-chimiques du milieu. On le retrouve dans les eaux sous diverses formes allant de l'ion libre (Cu^+ et Cu^{2+}) à des complexes plus volumineux (CuCO_3 , $\text{Cu}(\text{OH})_2$, $\text{Cu}(\text{OH})_3^-$, $\text{Cu}(\text{OH})_2^-$, chlorures, sulfates...), voire complexé à la matière organique (acides humiques, fulviques, particules).

A l'instar du zinc, le cuivre présente un aspect essentiel en entrant dans la composition du cœur catalytique de certaines enzymes (cytochrome c oxydase, superoxyde dismutase etc...). Son homéostasie implique une régulation à la fois intra et extra-cellulaire (Festa et Thiele, 2011). Il présente cependant une toxicité avérée si il est présent en excès dans la cellule, notamment par sa capacité à catalyser la production d'EROs par la réaction de Fenton (Balamurugan and Schaffner, 2006).

Cette toxicité ne lui a cependant pas valu de classification particulière par l'UE. Des seuils ont cependant été établis par l'UE pour la qualité des eaux de consommation en accord avec les recommandations de l'OMS : 2 mg Cu/L (Bisson et al., 2005c). En se basant sur les études toxicologiques réalisées, l'INERIS a estimé une $\text{PNEC}_{\text{eau douce}}$ de 1,6 $\mu\text{g Cu/L}$ et une $\text{PNEC}_{\text{eau marine}}$ de 0,8 $\mu\text{g Cu/L}$. Ce contaminant présente un intérêt particulier dans l'étude du bassin d'Arcachon puisqu'il est employé dans les peintures antisalissures des bateaux depuis l'interdiction du tributylétain (Claisse et Alzieu, 1993).

3.3. Un contaminant organométallique : le tributylétain

Le terme « organométallique » désigne une espèce chimique formée par un métal et une ou plusieurs fonctions organiques (McElroy et al., 2011). Le métal doit cependant former une liaison avec un carbone appartenant à la fonction organique qui est le plus souvent de type alkyle (méthyle, éthyle, butyle, hexyle). Le nombre de ces fonctions détermine le nom de la molécule (ex : éthyl-métal, dibutyl-métal, tributyl-métal).

Bien que certains de ces composés puissent être produits naturellement par l'action de certaines bactéries (méthylation), leur origine est principalement anthropique. Ils sont essentiellement employés comme pesticides (organo-mercuriels et organo-stanniques), additifs dans les carburants (méthyl- et éthyl-plomb), polymères ou comme catalyseurs (Craig, 2003).

Les organométalliques sont généralement présents à l'état de traces dans l'environnement, et leur toxicité à l'égard des organismes aquatiques dépend de nombreux paramètres (espèce chimique présente, accumulation, organismes exposés, réactivité du composé etc...).

Nous nous intéresserons donc dans cette section à une molécule emblématique pour le Bassin d'Arcachon : le tributylétain (TBT).

3.3.1. Généralités

Le TBT (CAS : 688-73-3) est un organométallique constitué d'étain (Sn), de trois fonctions butyles (C_4H_9) de formule $(\text{C}_4\text{H}_9)_3\text{Sn-X}$ où X est un élément chimique de nature variable en fonction de l'utilisation faite (F, OH, Cl etc...). Les espèces les plus connues sont l'oxyde de TBT (TBTO), le

benzoate de TBT (TBTB), le linoléate de TBT (TBTL), le fluorure de TBT (TBTF), le chlorure de TBT (TBTCl) etc... On retrouve ce composé dans des peintures antisalissures de bateaux, dans des traitements pour la préservation du bois ou de la pierre, des désinfectants, des biocides (fongicides, molluscicides). Cima et collaborateurs rapportent une production en 2003 d'environ 4000 tonnes de TBT (et composés associés) chaque année (Cima et al., 2003).

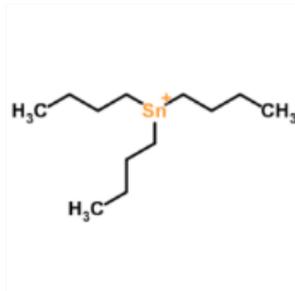


Figure 17 : Molécule de tributylétain (TBT)

Dans l'eau de mer, le TBT se retrouve principalement sous-forme dissoute (hydroxydes de carbonates ou chlorures). Il y présente vraisemblablement peu d'affinité pour les particules (5% adsorbés aux matières en suspension (Alzieu, 2000b)) et un stockage très limité dans les sédiments (à l'inverse de la situation en eau douce). Il est toutefois susceptible de se dégrader par action microbologique ou photolytique avec une demi-vie allant de quelques jours à quelques semaines. Ses produits de dégradation sont le dibutylétain et le monobutylétain (DBT et MBT) qui présentent une toxicité inférieure. Il est généralement admis que le TBT est une substance hydrophobe (Alzieu, 2000b) présentant un coefficient de répartition octanol/eau ($\log K_{ow}$) compris entre 3,21 et 3,85 (TBTCl à pH 5,8 et 7,8).

L'utilisation de revêtements contenant du TBT est interdite au niveau européen depuis le 1^{er} juillet 2003 (Parlement européen et Conseil de l'Union Européenne, 2003). La directive 2002/62/CE (Commission des Communautés européennes, 2002) interdit par ailleurs la mise sur le marché et l'utilisation d'organostanniques comme composants biocides dans les peintures antisalissures sur les navires de toute longueur et les appareillages immergés de piscicultures ou de conchyliculture (Brignon, 2005). Le TBT et ses composés sont des substances prioritaires de l'UE qui indique une NQE-MA dans les eaux de surfaces intérieures 0,2 ng/L (Parlement européen et Conseil de l'Union Européenne, 2008). Cette interdiction a cependant entraîné le retour vers l'utilisation de composés antisalissures organiques tels que le diuron, le chlorothalonile, le dichlofluanide (Konstantinou et Albanis, 2004) ou de produits à base de cuivre, ce qui est à l'origine d'une augmentation de ses concentrations dans les huîtres du Bassin d'Arcachon (Terlizzi et al., 2001).

3.3.2. Toxicité

Le TBT est étudié depuis longtemps précisément en raison de sa forte toxicité à faibles doses. Les travaux de Claude Alzieu ont notamment permis d'établir une relation dose-effet dans les milieux aquatiques (Alzieu, 2000a) : < 1 ng/L – effet sur la sexualité des gastéropodes (imposex) ; 1 ng/L – effets sur la croissance du plancton ; < 2 ng/L – anomalies de calcification chez *C.gigas* ; 20 ng/L –

effets sur la reproduction de *C.gigas*. Sa toxicité sur l'huître est largement renseignée dans la littérature (Alzieu et Heral, 1984) puisque ce contaminant a été impliqué dans une crise ostréicole majeure dans les années 70 au niveau du bassin d'Arcachon (Alzieu et al., 1989)

L'imposex est un des effets délétères emblématiques du TBT et souligne le statut de perturbateur endocrinien de ce contaminant. Ce phénomène largement décrit dans la littérature consiste en l'apparition de caractères sexuels mâles chez des gastéropodes femelles (Alzieu, 1998). Six stades ont été différenciés chez *Nucella lapillus*, allant de la formation d'un *vas deferens* (conduit reliant le pénis à la prostate chez les mâles) au blocage complet des oviductes (stérilité). L'imposex survenant à des concentrations très faibles, il est devenu un biomarqueur phare de la contamination en TBT dans les zones côtières. Un suivi est d'ailleurs réalisé annuellement dans le cadre de la Convention Oslo – PARIS (OSPAR) dont l'objectif est de coordonner au niveau international la protection du milieu marin pour le Nord-Est Atlantique. Cet outil de surveillance du littoral a permis de mettre en évidence une réelle régression du TBT dans les eaux côtières françaises depuis les années 80. En dépit d'indices de masculinisation moyens faibles les derniers suivis réalisés au niveau du bassin d'Arcachon indiquent cependant des valeurs maximales parfois élevées (*Vas Deferens* séquence maximale de 4/6 : *vas deferens* complet reliant la papille génitale au conduit pénien (Toxem, 2012)).

La perturbation de la calcification de l'huître est un autre des effets majeurs reconnus du TBT. Ce phénomène est aussi appelé « Chambrage » des coquilles, puisqu'il consiste en l'apparition de « chambres » contenant un gel riche en protéines différentes de la conchyoline habituellement impliquée dans la calcification.

Le TBT est un composé hautement toxique potentiellement assimilable par voie dissoute et trophique (Rüdel, 2003). Ses effets ont été démontrés sur de nombreuses espèces : neurotoxicité chez le rat (Suzuki and Ishido, 2011) ; stress oxydant chez *Meretrix meretrix* (Huang et al., 2005) ; malformations embryonnaires chez *Xenopus tropicalis* (Guo et al., 2010) ; perturbation de la respiration cellulaire chez *Mytilus galloprovincialis* (Nesci et al., 2011) ; perturbations de la croissance et stress oxydant chez *Gomphina veneriformis* (Park et al., 2012) ; perturbation endocrinienne chez *Danio rerio* (McGinnis and Crivello, 2011) etc... Certains travaux font également état d'effets reprotoxiques et obsésogènes chez des mammifères supérieurs (Graceli et al., 2013).

3.4. Les contaminants organiques

3.4.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Les HAPs sont une large famille de composés formés de carbone et d'hydrogène. Ce sont des contaminants ubiquistes constitués de deux cycles aromatiques benzéniques ou plus et présentant une conformation planaire. Certains peuvent contenir du soufre (ex : dibenzothiophène) ou des ramifications alkylées (Crespo, 2009).

Ils sont réputés pour leur stabilité chimique et leur hydrophobicité qui augmente avec le nombre de cycles et la masse moléculaire (Kim et al., 2013). On considère généralement les HAPs « légers » qui possèdent 4 cycles ou moins, et les « lourds » qui présentent plus de 4 cycles.

On distingue trois sources principales pour ces composés (Neff et al., 2005) : pétrogénique (combustibles fossiles), pyrolytique (combustion incomplète de la matière organique) et diagénétique (transformation de précurseurs naturels par des processus chimiques ou biologiques). Les deux premières classes sont les plus connues. Les HAPs pétrogéniques contenus dans les pétroles sont généralement légers et se caractérisent par une forte abondance en composés alkylés (méthyle-, éthyle-, butyle-). La formation pyrolytique des HAPs résulte de la combustion incomplète de la matière organique. Après un chauffage à haute température et un refroidissement rapide, des éléments chimiques organiques peuvent se condenser sous-forme de HAP. Les éléments à 2 ou 3 cycles sont particulièrement abondants dans la phase gazeuse, en revanche les HAPs plus lourds (4 à 6 cycles) sont plus abondants dans la phase particulaire. Leur présence dans les milieux aquatiques est donc liée à des dépôts atmosphériques sur la surface de l'eau, au lessivage des bassins versants (par l'intermédiaire des particules) ou à l'introduction directement dans le milieu par utilisation des moteurs des bateaux par exemple.

Le profil moléculaire d'un échantillon donné, en fonction des abondances relatives de chaque composé, peut donc donner des indications concernant l'origine de ces hydrocarbures à l'aide de rapports (Tobiszewski et Namieśnik, 2012) tels que « Anthracène / Anthracène + Phénanthrène » (pyrolytique ou pétrogénique).

Leur répartition globale est principalement due à l'utilisation massive des combustibles fossiles. Des sources naturelles d'exposition existent avec les feux de forêts ou les éruptions volcaniques, mais les émissions anthropiques sont plus variées et massives : 35% des HAPs en zone urbaine proviennent des moteurs de véhicules, mais on les retrouve également dans les fumées d'industries manufacturières ou la fumée de cigarette (Donnelly et Naufal, 2010). Une autre étude plus récente rapporte au niveau atmosphérique mondial en 2007 : 60,5% des émissions totales proviendraient de la combustion de biomasse (bois de chauffage, résidus céréaliers) dans le secteur résidentiel et commercial, 12,8% proviendraient des transports et 11,2% de la déforestation et des incendies (Shen et al., 2013).

La toxicité de ces composés est largement renseignée, ce qui a entraîné le classement de 16 d'entre eux comme « substances prioritaires » par l'US EPA : le naphthalène (N), l'acénaphthylène (Acty), l'acénaphthène (Acte), le fluorène (Fe), le phénanthrène (Phe), l'anthracène (An), le fluoranthène (Fluo), le pyrène (Pyr), le chrysène (Chrys), le benzo(a)anthracène (BaA), le benzo(k)fluoranthène (BkF), le benzo(b)fluoranthène (BbF), le benzo(a)pyrène (BaP), le dibenzo(a,h)anthracène (DahA), l'indéno(1,2,3-c,d)pyrène (IP) et le benzo(g,h,i)pérylène (BP). L'UE a également classé certains de ces composés comme prioritaires : N, An, Fluo, BkF, BbF, BaP, IP, BP (Parlement européen et Conseil de l'Union Européenne, 2008).

Les mécanismes de toxicité des HAPs sont en général liés à leur métabolisation (« activation métabolique »). Une fois dans la cellule, ces composés sont pris en charge par des systèmes enzymatiques de métabolisation de phase I (oxydation par les cytochromes P450) qui vont contribuer à diminuer leur hydrophobicité en vue d'une excrétion ultérieure. Certains métabolites sont cependant hautement réactifs et peuvent soit contribuer à la production d'EROs (cf. 3.3. Le stress oxydant) ou bien directement interagir avec les composants cellulaires tels que l'ADN pour former des adduits ou générer des cassures (Akcha et al., 2000a, 2000b; Xue et Warshawsky, 2005).

Situation dans le Bassin d'Arcachon (Crespo, 2009)

D'après les travaux menés en 2009 par Alexia Crespo, les HAPs sont principalement d'origine pyrolytique. Ils sont présents dans la colonne d'eau du bassin d'Arcachon à des concentrations dissoutes globalement très faibles allant de 5 à 20 ng/L. Ces résultats sont en accord avec l'hydrophobicité des hydrocarbures ; la phase dissoute est dominée par les composés les plus légers (ex. : naphthalène, phénanthrène).

Cela explique que ces composés se retrouvent principalement dans le bassin sous forme particulaire. La contamination de ce compartiment est vraisemblablement tributaire des événements tidaux et météorologiques qui conditionnent les remises en suspension du sédiment ou les apports de particules par les tributaires. Globalement une spatialisation de la contamination est observable avec les niveaux les plus faibles mesurés près de la sortie du bassin (< 1000 ng/g, ps) et les niveaux les plus élevés dans les sites les plus internes telles que le Tès (jusqu'à plus de 3000 ng/g, ps).

Le compartiment sédimentaire en revanche présente une forte hétérogénéité spatiale et temporelle. Il ressort des études menées en 2009 que la contamination de ce compartiment est principalement tributaire de la granulométrie et de la teneur en carbone organique : la contamination est maximale pour des particules < 63 µm et une teneur de 1-5% de carbone organique (valeurs dépassant parfois les 10000 ng HAP/g, ps). Les autres classes de sédiments sont contaminées à moins de 500 ng HAP/g, ps voire à des niveaux inférieurs aux limites de quantification dans le cas de sédiments très sableux (Arguin).

Les huîtres présentaient des empreintes moléculaires cohérentes avec une contamination principalement liée au compartiment particulaire/sédimentaire avec une dominance des HAPs de poids moléculaire intermédiaire. Le biota semble globalement présenter une augmentation de la contamination depuis une quinzaine d'année, se rapprochant les valeurs observées de la valeur guide AFSSA pour la consommation humaine de 500 ng HAP/g, ps.

Composés utilisés durant l'approche expérimentale (Figure 18)

Le phénanthrène (CAS : 85-01-8)

Ce composé présente un log K_{ow} de 4,6 indiquant une forte propension à traverser les membranes biologiques. Bien que le phénanthrène soit classé D par l'US EPA (non cancérigène pour l'Homme) et 3 par l'IARC (inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme) sa toxicité à l'égard d'autres organismes est réelle : stress oxydant chez *Pecten maximus* (200 µg/L – 7 jours (Hannam et al.,

2010)) ; modification du protéome chez *Eisenia fetida* (0,5 – 2,5 – 12,5 mg Phe/kg sol sec – 28 jours (Wu et al., 2013)) ; malformations cardiaques chez *Danio rerio* (50 nmol/L – 72h (Zhang et al., 2013)) ; malformation oculaires chez *Danio rerio* (0,02 – 0,2 – 2 µM – 72h (Huang et al., 2013)).

Le fluoranthène (CAS : 206-44-0)

Avec un log K_{ow} de 5,1 le fluoranthène présente également une bonne biodisponibilité. Il est classé D par l'US EPA, classé 3 par l'IARC, et l'UE indique une NQE-MA pour les eaux douces et marines de 100 ng/L. Des études ont démontré sa toxicité à l'égard de divers organismes tels que : stress oxydant chez *Lemna minor* (0,1 – 1 mg/L – 4 et 10 jours (Zezulka et al., 2013)) ; génotoxicité dans des hépatocytes de *Solea solea* (0,5 – 5 - 50 µM – 24h (Wessel et al., 2012)) ; stress oxydant chez *Carcinus maenas* (2,56 – 100 µg/L – 7 jours (Rodrigues et al., 2013)) ; réponse immunitaire modifiée chez le rat (contamination aigüe et chronique sur 90 jours (Knuckles et al., 2004)).

Le pyrène (CAS : 129-00-0)

Ce HAP est aussi classé D par l'US EPA, classé 3 par l'IARC et son log K_{ow} est de 5,32. Sa toxicité a été montrée : chez *Mallotus villosus* (embryotoxicité – 55 µg/L – 32 jours avant éclosion (Frantzen et al., 2012)) ; chez *Carcinus maenas* (immunodéficiência des juvéniles – 200 µg/L – 7 jours (Dissanayake et al., 2008)). C'est un composé modèle en toxicologie des HAPs car sa biotransformation est simple (1-hydroxy-pyrène après phase I). Une étude a notamment montré le transfert trophique de ses métabolites (Carrasco Navarro et al., 2013) vers un prédateur (*Gammarus setosus*) après contamination des proies (*Chironomus riparius* et *Lumbriculus variegatus*).

Le benzo(a)anthracène (CAS : 56-55-3)

Le BaA est classé B2 par l'US EPA (potentiellement cancérigène pour l'Homme) et 2B par l'IARC (peut-être cancérigène pour l'Homme). Il n'est pas classé par l'UE, mais l'anthracène l'est avec une NQE-MA pour les eaux de surface de 100 ng/L. Le lien avec le développement de cancers a été démontré chez la souris. Son log K_{ow} est de 5,61, ce qui explique les niveaux importants de contamination observés chez *Mytilus galloprovincialis* (Yakan et al., 2011) lors d'expositions en laboratoire (3 – 6 – 9 µg/L – 30 jours).

Le chrysène (CAS : 218-01-9)

Le chrysène est également classé B2 par l'US EPA, 2B par l'IARC et présente un log K_{ow} de 5,91. Globalement peu étudié au niveau toxicologique, une étude a tout de même mis en évidence un stress oxydant lié au chrysène dans des kératinocytes humains (lignée cellulaire HaCaT – 1 µg Chrys / mL – 72h).

Le benzo(b)fluoranthène (CAS : 205-99-2)

Son log de K_{ow} est de 6,12 et il est également classé B2 par l'US EPA et 2B par l'IARC. C'est aussi une des substances prioritaires de l'UE avec une NQE-MA pour les eaux de surface de 30 ng/L associé au benzo(k)fluoranthène. Peu d'études sont disponibles concernant sa toxicité. Elle a cependant été démontrée chez : *Ruditapes decussatus* (stress oxydant et génotoxicité à 250 – 800 ng BbF/g de sédiments – 28 jours (Martins et al., 2013)) et chez la souris (toxicité transgénérationnelle de mères

gestantes vers les nouveaux nés mâles – 20 – 200 – 2000 µg BbF/g masse corporelle (Kim et al., 2011)).

Le benzo(a)pyrène (CAS : 50-32-8)

Ce contaminant est classé B2 par l'US EPA mais groupe 1 par l'IARC (cancérogène pour l'Homme) et catégorie 2 par l'UE (devant être assimilé à des substances cancérogènes pour l'Homme). L'UE indique une NQE-MA dans les eaux de surface de 50 ng/L. Son log de K_{ow} est de 6,50. Le BaP est un composé emblématique de l'étude des HAPs. De nombreuses études rapportent ses effets sur d'autres organismes : modification du protéome chez *Mytilus galloprovincialis* (10 µg BaP/L – 7 jours (Maria et al., 2013)) ; stress oxydant chez *Mytilus galloprovincialis* (50 mg BaP/kg sec de moule – 28 jours (Akcha et al., 2000b)) ; potentialise l'induction des MTs face au cuivre chez *Fundulus heteroclitus* (0,21 µg BaP/g nourriture sèche – 7 jours (Roesijadi et al., 2009)) ; stress oxydant chez *Scapharca inaequivalvis* (440 µg/L – 36h - (Monari et al., 2007)) ; embryotoxicité et dommages à l'ADN chez *Crassostrea gigas* (0,2 – 20 nM – 20h ou 16h (Wessel et al., 2007)) ; réponse transcriptomique chez la souris (approche toxicogénomique – 25 – 50 – 75 mg BaP/kg masse corporelle/jour - 28 jours (Labib et al., 2013)).

L'indéno(1,2,3-c,d)pyrène (CAS : 193-39-5)

Il est classé B2 par l'US EPA, 2B par l'IARC et présente un log K_{ow} de 6,58. L'UE préconise une NQE-MA dans les eaux de surfaces de 2 ng/L en association au benzo(g,h,i)perylène. Aucune étude récente n'a été trouvée concernant sa toxicité à l'égard d'autres organismes. La fiche technique de ce composé INERIS (Bisson et al., 2005) fait cependant état d'anciens travaux des années 60 à 80 ayant démontré l'occurrence de tumeurs chez des souris et des rats exposés à l'IP par voie cutanée, pulmonaire ou suite à des injections.

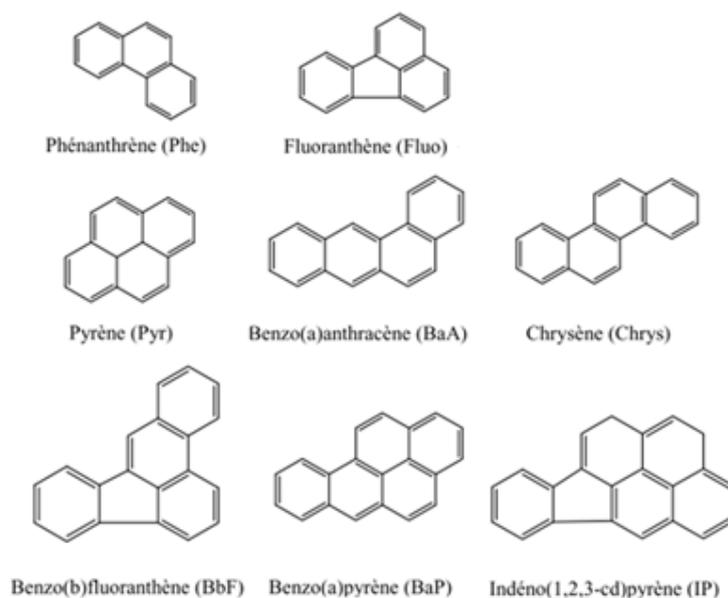


Figure 18 : Structure des 8 HAPs utilisés lors de l'approche expérimentale

3.4.2. Les pesticides

Les pesticides sont des composés chimiques employés notamment en agriculture pour la lutte contre les ravageurs ou pour d'autres raisons telles que la préservation du bois. Il s'agit d'une très large famille pouvant comprendre des composés synthétiques destinés à tuer (acaricides, algicide, bactéricide, fongicide, herbicide, insecticide, nématicide, rodenticide, molluscicide...) ou présentant des effets subléthaux destinés à réguler la croissance de certains organismes (Nimmo et Mcewen, 1997). On peut ainsi les classer en fonction de leur cible, mais également en fonction de leur structure chimique : carbamates, organophosphorés, organochlorés, pyréthrénoïdes...(Collotta et al., 2013).

Les produits employés pour le traitement des cultures sont en général constitués du principe actif présentant un caractère toxique, mélangé dans un solvant tel que l'eau. L'épandage de cette formulation est réalisé sur les cultures, ce qui implique un transport éolien des composés et une contamination des sols pouvant affecter la vie sauvage environnante et des espèces non ciblées (Capinera, 2010). Les lessivages des sols, les transports atmosphériques et les dépôts atmosphériques sont donc des sources potentielles de pesticides pour les milieux aquatiques. Le devenir de ces contaminants dans la colonne d'eau varie grandement en fonction de leurs propriétés chimiques (dégradation, adsorption, dissolution, bioaccumulation...).

Les pesticides présentent donc un problème majeur, en lien avec des considérations de santé publique et environnementales. Leur réglementation varie d'un composé à l'autre, mais en France, la concentration d'un composé ne doit pas dépasser 100 ng/L, et la concentration de la somme des composés ne doit pas dépasser les 500 ng/L. Une exception est faite pour la somme des concentrations en aldrine, dieldrine, endrine et isodrine qui ne doit pas dépasser la NQE-MA dans les eaux de surfaces intérieures de 10 ng/L et de 5 ng/L dans les autres eaux de transition (Parlement européen et Conseil de l'Union Européenne, 2008). Ces composés sont d'ores et déjà mis en cause dans l'avènement de nombreuses maladies telles que les cancers, certains diabètes, la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer etc...(Mostafalou et Abdollahi, 2013). De nombreuses études rapportent également des effets épigénétiques chez les vertébrés. Ce type de modification est transmissible d'une génération à l'autre ce qui souligne le caractère hautement toxique de certaines de ces molécules (Collotta et al., 2013).

Situation dans le Bassin d'Arcachon (Belles, 2012)

Les programmes de recherche locaux ont permis de mettre en place un suivi long terme de ces substances au sein des eaux de la baie et de ses tributaires en 2009 – 2010.

Ces études rapportent une empreinte moléculaire caractérisée par la dominance du s-métolachlore, de l'acétochlore et de leurs métabolites dans les principaux tributaires de la baie. Ces herbicides sont utilisés en maïsiculture, une activité très répandue au niveau des bassins versants des cours d'eau considérés (Leyre, Bourg, Canal des Landes, Cires, Lanton, Canal des étangs). Le Pontails présente une forte contamination en isoproturon (potentiellement liée au centre d'enfouissement d'Audenge) et

le Beteq présente une contamination en hydroxy-atrazine, un métabolite de l'atrazine (potentiellement liée à une contamination historique résiduelle).

Les analyses menées sur les différents compartiments de la lagune ont permis de mettre en évidence de fortes proportions des métabolites du s-métolachlore et de l'acétochlore dans la colonne d'eau. Ces composés se retrouvent dans le sédiment de surface accompagnés par les métabolites du diuron et majoritairement de l'irgarol dont les propriétés favorisent l'adsorption aux particules.

L'irgarol, le diuron et ses métabolites, sont des composés présents dans les peintures antisalissures des bateaux. Leur présence dans la colonne d'eau provient donc principalement des activités nautiques, ce qui explique des pics de concentration en été lorsque les chantiers navals sont en pleine activité.

On en conclut donc que la présence de pesticides dans la baie, bien que présentant une saisonnalité liée à l'hydrodynamisme de la lagune et aux périodes d'épandage, est liée à des apports par les tributaires mais également à des sources internes liées au nautisme. Des tendances saisonnières récurrentes ont également montré des pics de contamination dans les eaux de surface en hiver, découplés des périodes d'épandages, indiquant un stockage potentiel des contaminants dans les sols et la nappe phréatique, puis un relargage à la faveur des fortes pluviométries.

Les concentrations par composé sont presque toujours inférieures aux PNEC, hormis dans des zones très précises telles que les ports. Bien que vraisemblablement faible, le danger pour le compartiment biologique demeure réel puisque ces seuils ne tiennent pas compte d'éventuels effets mélanges et des influences des facteurs environnementaux ou les stades de développement des organismes vivant dans la lagune.

Composés utilisés durant l'approche expérimentale (Tableau 2)

Imidaclopride (CAS : 138261-41-3)

Cet insecticide est un néonicotinoïde très largement employé depuis sa mise sur le marché en 1991. Il est utilisé pour éradiquer de nombreux parasites tels que les termites ou les parasites des animaux domestiques. L'imidaclopride agit comme une neurotoxine en se fixant aux récepteurs nicotiques de l'acétylcholine, ce qui peut avoir pour effet de bloquer la transmission des signaux nerveux chez les insectes (Cycoń et al., 2013). Ce composé est cependant suspecté d'affecter également les insectes pollinisateurs tels que les abeilles, avec un rôle potentiel dans le déclin de ces populations depuis 2006 (Gregorc et al., 2012; Whitehorn et al., 2012). Sa présence dans les sols est due à l'épandage sur les cultures, au « lessivage » des feuilles des plants traités, ou à la diffusion à partir de granules ou de graines traitées. En fonction des conditions physico-chimiques du sol, son temps de demi-vie peut varier de 27 à 229 jours. Il peut impacter notamment la faune microbienne qui s'y trouve (Cycoń et al., 2013), mais également d'autres organismes tels que l'escargot *Helix aspersa* (modifications des réserves énergétiques et des activités enzymatiques (Radwan and Mohamed, 2013)); le rat albinos (hépatotoxique (Toor et al., 2013)); le gammare *Gammarus roesili* (reprotoxique (Böttger et al., 2013)).

S-métolachlore (CAS : 87392-12-9)

Ce composé est un herbicide de la famille des chloroacétamides. Il est l'un des plus utilisés en agriculture pour le contrôle en pré-levée de végétaux indésirables. Il s'agit de l'énantiomère actif du métolachlore, originellement utilisé sous sa forme racémique : un mélange des deux énantiomères R et S (H. Liu et al., 2006). Sa toxicité cependant s'exerce également sur des organismes non ciblés comme le rapportent certaines études sur : *Daphnia magna* (H. Liu et al., 2006) ; des lignées cellulaires humaines HepG2 sous formulation commerciale (Nikoloff et al., 2013) ; *Eisenia fetida* (Xu et al., 2010) ; *C. gigas* (Mai et al., 2013). Les formulations commerciales semblent en général plus toxiques que le composé pur (Joly et al., 2013). De la même manière la forme racémique présente souvent une toxicité supérieure. Actuellement, seul le S-métolachlore est employé en agriculture.

Acétochlore (CAS : 34256-82-1)

L'acétochlore est également un herbicide de la classe des chloroacétamides. Cette famille de composés agit notamment en inhibant l'élongation des chaînes d'acides gras poly-insaturés et donc le développement cellulaire des végétaux (Paule et al., 2013). Sa toxicité s'exprime chez *Eisenia fetida* à des doses supérieures à celles trouvées en champs (20-80 mg/kg - (Xiao et al., 2006)). Il agit également en interférant avec les récepteurs thyroïdiens chez certains lissamphibiens tels que *Rana catesbeiana* (Helbing et al., 2006), ou chez certains poissons tels que *Gobiocypris rarus* (Li et al., 2009). Il a également été associé à un stress oxydant accru chez *Bufo raddei* (Liu et al., 2006).

Diuron (CAS : 330-54-1)

Le diuron est un herbicide à large spectre de la famille des « urées substituées » (ou phénylurée). Il agit notamment en inhibant le transfert électronique lors de la photosynthèse au niveau du photosystème II. L'Europe a interdit la mise sur le marché de préparations à base de diuron en 2007 (Commission des Communautés Européennes, 2007). L'UE le classe dans les substances prioritaires et a fixé une NQE-MA dans les eaux de surfaces de 200 ng/L. De nombreuses études soulignent la toxicité de ce composé : génotoxicité et embryotoxicité chez *Crassostrea gigas* à 50 ng/L (Akcha et al., 2012) ; réduction de la croissance dès 1 µg/L chez *Zostera marina* (Chesworth et al., 2004) ; stress oxydant chez *Synechococcus sp.* (Deng et al., 2012) ; diminution des capacités de récupération des communautés microbiennes d'eau douce (Pesce et al., 2006) ; diminution du succès de fertilisation chez *C. gigas* (Mai et al., 2013).

Irgarol 1051 (CAS : 28159-98-0)

L'irgarol 1051 (ou cybutryne) fait partie de la famille des triazines. C'est un algicide employé dans les peintures antisalissures pour protéger les carènes des bateaux du développement d'organismes vivants. A l'instar du diuron, son utilisation résulte de l'interdiction relative aux organoétains dans ce type de préparations. Ce composé agit en perturbant le transfert électronique du photosystème II chez les organismes photosynthétiques. Il est vraisemblablement stable et persistant dans le milieu aquatique avec une demi-vie estimée aux alentours de 100 jours dans l'eau de mer (Liang et al., 2013). Sa toxicité ne concerne cependant pas que les végétaux tels que *Zostera marina* (réduction de croissance après 10 jours d'exposition à 1 – 5 µg/L - (Chesworth et al., 2004)) ou les cyanobactéries telles que

Synechococcus sp. (EC50 = 0,019 μM pour 96h (Deng et al., 2012)). Des effets chez les animaux ont également été rapportés : diminution de la production de ROS des mitochondries du foie de *Siganus fuscescens* (4 $\mu\text{g/L}$ – 15 minutes (Liang et al., 2013)) ; diminution des capacités de fertilisations des spermatozoïdes de *C. gigas* (2,5 – 22 ng/L) et du succès de fertilisation (1 $\mu\text{g/L}$) (Mai et al., 2013) ; stress oxydant et apoptose sur des lignées cellulaires HepG2 (Wang et al., 2013).

Carbendazime (CAS : 10605-21-7)

C'est un fongicide de la famille des carbamates utilisé en agriculture. Ce composé présente une persistance dans les sols variant avec les conditions chimiques du milieu pouvant aller de 3 semaines à 14 (Wang et al., 2012). Sa toxicité s'exerce ainsi sur les organismes habitant les sols tels que les vers (stratégies d'évitement chez *Allolobophora chlorotica* (Ellis et al., 2010)) ; les communautés microbiennes (diminution de diversité (Wang et al., 2012)). Les végétaux cultivés peuvent également subir un stress oxydant lié à l'exposition à ce contaminant : tomate (Wang et al., 2010) ; concombre (Zhang et al., 2007).

Dichlofluanide (CAS : 1085-98-9) et Chlorothalonile (CAS : 1897-45-6)

Ces composés sont employés dans les peintures antisalissures. Des études rapportent leur toxicité : sur des larves d'invertébrés marins (diminution de croissance, recrutement et embryogenèse (Bellas, 2006)) et sur des hépatocytes isolés de rats (cytotoxicité, peroxydation lipidique (Suzuki et al., 2004)). Il a également été montré que le chlorothalonile pouvait induire un stress oxydant dans les hémocytes d'un tunicidé : *Botryllus schlosseri* (Cima et al., 2008) ; il impacte aussi le développement et la croissance du lissamphibien *Xenopus laevis* (malformations à 3,2 – 25 $\mu\text{g/L}$ sur 96h (Yu et al., 2013)).

Tableau 2 : Propriétés des pesticides utilisés lors des approches expérimentales

Composé	Famille	Formule brute	Masse molaire (g/mol)	log K _{ow}	Ecotoxicologie ($\mu\text{g/L}$)
Imidaclopride	Insecticide	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	255.7	0.6	MAC : 0,03
S-metolachlore	Herbicide	C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	283.8	2.0	/
Acetochlore	Herbicide	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	269.8	4.1	EC ₅₀ : 2200
Diuron	Herbicide	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	233.1	2.9	PNEC _{ch} : 0,2
Irgarol 1051	Algicide	C ₁₁ H ₁₉ N ₅ S	210.9	4.0	EC ₅₀ : 400
Carbendazime	Fongicide	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	191.2	1.5	MAC : 0,07
Dichlofluanide	Fongicide	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ FN ₂ O ₂ S ₂	333.2	3.5	/
Chlorothalonile	Fongicide	C ₈ C ₁₄ N ₂	265.9	2.9	/

Les informations de ce tableau proviennent du site de l'INERIS (<http://www.ineris.fr/substances/fr/>). Les valeurs seuils fournies sont de diverses natures car les connaissances concernant la toxicité de chaque composé sont très hétérogènes : MAC – Maximum Acceptable Concentration ; EC₅₀ – Effect Concentration 50% ; PNEC_{ch} – Predicted Non Effect Concentration chonical.

4. Les biomarqueurs

4.1. Définition

Le terme de « biomarqueur » apparaît dès 1987 aux Etats-Unis où une définition est établie par le conseil national de la recherche (National Research Council – NRC) :

« A xenobiotically induced variation in cellular or biochemical components or processes, structures or functions that is measured in a biological system or sample » (cité par (Monserrat et al., 2012)).

En français il s'agirait donc d'une « modification de composants, processus, structures ou fonctions cellulaires ou biochimiques induite par un xénobiotique dans un système ou échantillon biologique ». Cette définition a été étendue aux modifications comportementales qui peuvent également être modifiées par toute sorte de perturbations. Elles font par ailleurs le lien entre les réponses biochimiques et métaboliques d'un organisme et les effets d'une substance (Monserrat et al., 2007).

Les biomarqueurs peuvent répondre de manière plus ou moins spécifique à certaines substances ou familles de substances. On distingue en général les biomarqueurs d'exposition et d'effet (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003).

Les biomarqueurs d'exposition traduisent une modification de l'environnement. Les paramètres les plus classiques de ce groupe sont les mesures de bioaccumulation du contaminant lui-même, ou de son/ses métabolites. D'autres indicateurs biologiques font partie de cette famille telles les métallothionéines (MTs) qui traduisent en général une contamination métallique ou l'expression/l'activité du cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) qui est lié à la présence de contaminants organiques (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). Les modifications de ces paramètres biologiques résultent d'une exposition à un/plusieurs contaminant(s) et reflètent la réponse adaptative des organismes. Ils ne peuvent être associés seuls à des effets délétères.

Les biomarqueurs d'effet, traduisent la toxicité d'une contamination à l'égard de l'organisme étudié. Ils sont en général associés à des paramètres biologiques tels que les dommages à l'ADN, les adduits à l'ADN, l'activité acétylcholinestérase (AChE), la peroxydation lipidique etc...

La limite entre ces deux groupes est bien-entendu mince, et la classification des biomarqueurs dépend grandement à la fois du contaminant et de l'étude menée. De manière globale, pour améliorer la compréhension du fonctionnement d'un écosystème, il est nécessaire d'utiliser plusieurs biomarqueurs complémentaires, choisis pertinemment en fonction des objectifs fixés.

4.2. Les biomarqueurs étudiés

Les biomarqueurs déployés durant ces travaux comprennent principalement des indicateurs d'exposition mais également des indicateurs d'effets. Des biomarqueurs généralistes à l'échelle de l'individu tels que la croissance du corps mou, de la taille de la coquille ou les indices de condition ont permis d'observer sur le terrain l'état de santé global des organismes.

La bioaccumulation des métaux (cuivre, zinc et cadmium) et des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) a également été évaluée afin de rendre compte de l'exposition aux contaminants, et cela à l'échelle de l'organe si possible (plus de détails dans la section précédente).

D'autres biomarqueurs plus spécifiques ont été employés à l'échelle de la cellule aussi bien pour les approches de terrain que pour les approches expérimentales. La production de métallothionéines a donc été évaluée, et l'étude des expressions géniques relatives de 10 gènes impliqués dans la réponse au stress a également été réalisée. Les collaborations établies pour certaines approches expérimentales ont permis d'étudier certains paramètres supplémentaires tels que la génotoxicité (test comète) ou les profils protéomiques (gels 2D).

4.2.1. Les métallothionéines

4.2.1.1. Généralités

Les métallothionéines (MTs) sont de petites protéines cytosoliques (<10 kDa) présentant un rôle majeur dans la régulation des métaux essentiels (cuivre ou zinc) et la séquestration des métaux non essentiels (cadmium, mercure...). Elles ont historiquement été découvertes en 1957 dans le rein du cheval (Margoshes et Vallee, 1957) et ont depuis été le centre d'attention de nombreux travaux chez les vertébrés comme les invertébrés (Capdevila et al., 2012).

Ces protéines sont présentes chez tous les eucaryotes. En l'absence de métal, les thionéines semblent présenter une structure désordonnée dans le cytosol et adoptent une forme tridimensionnelle lors de l'association à leurs ligands pour devenir des métallothionéines. De manière générale, leur forme évoque celle d'une « altère » possédant deux groupements distincts (ou clusters). Typiquement, le groupement α permet de séquestrer 4 ions métalliques divalents (Cd(II), Zn(II), Cu(II)...) et le groupement β trois ions (Romero-Isart et Vasák, 2002). Les deux clusters sont reliés par une charnière hautement conservée constituée de deux lysines (Lys-Lys). La Figure 19 présente l'exemple de l'isoforme 2 des MTs chez le rat, dont la structure 3D a été révélée par cristallographie aux rayons X (Vasák, 2005).

Elles sont thermostables et se caractérisent notamment par une structure primaire riche en cystéines (15 à 30%) (Capdevila et al., 2012). Cet acide-aminé possède une fonction thiol (S-H) primordiale dans la réactivité de la protéine, puisque c'est à ce niveau que se forment les liaisons avec les métaux essentiels comme non essentiels.

Ces propriétés biochimiques confèrent aux MTs une grande réactivité à l'égard des métaux et des espèces radicalaires de l'oxygène (EROs) (Ruttkay-Nedecky et al., 2013). L'affinité des métaux pour

les fonctions thiols des MTs décroît par ailleurs de cette manière d'après les travaux de Visàk en 1991 (cité par (Amiard et al., 2006)) : $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^+, \text{Ag}^+, \text{Bi}^{3+} \gg \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$.

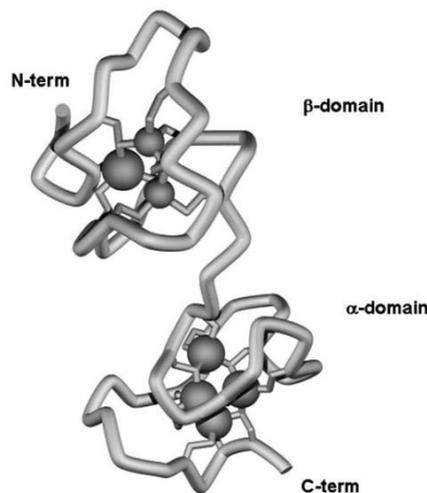


Figure 19 : Structure 3D de l'isoforme 2 des MTs de rat (issue de Vasàk, 2005)

En conséquence, les MTs sont impliquées dans une variété de processus biologiques et leur induction ne saurait être résumée à une « simple » exposition aux métaux. La littérature rapporte notamment une transcription des gènes impliqués face à des chocs thermiques, des changements de pH, le jeûne, les hormones, les cytokines ou de nombreuses drogues (Capdevila et al., 2012). Il existe cependant de nombreuses isoformes dont la réactivité et le rôle varie d'une espèce à l'autre et en fonction des ligands potentiels.

4.2.1.2. Les MTs chez *Crassostrea gigas*

Les MTs ont été largement étudiées depuis leur découverte chez les invertébrés aquatiques. Des travaux chez l'huître américaine *C. virginica* ont indiqué dès les années 90 une modulation du niveau transcriptomique du gène des MTs chez des animaux exposés au Cd (Unger et Roesijadi, 1996). Le rôle de ces protéines face à une contamination métallique chez les mollusques est aujourd'hui admis (Amiard et al., 2006), comme leur implication dans la lutte contre le stress oxydant (Anderson et al., 1999; Ruttkay-Nedecky et al., 2013). Il apparaît cependant que ces protéines possèdent également un rôle dans le développement des organismes. Des augmentations notables de leur concentration ont déjà été rapportées lors des phases de gamétogenèse, et particulièrement dans les gonades. Ces observations soulignent le rôle potentiel des MTs dans la survie des jeunes larves face à la présence de métaux dans leur environnement (homéostasie des métaux essentiels, lutte contre les EROs ou séquestration des métaux toxiques) et impliquent un transfert de protéines dans les gamètes (Mao et al., 2012).

Comme précisé précédemment, de nombreuses isoformes de la protéine peuvent coexister chez un même organisme. L'huître japonaise en présente 3 : CgMT1, CgMT2, CgMT3 (Marie et al., 2006b; Tanguy et Moraga, 2001; Tanguy et al., 2001). Les travaux de Tanguy et collaborateurs ont entre autre proposé une différence dans la structure entre les isoformes 1 et 2 présentée dans la Figure 20 qui reste cependant à confirmer expérimentalement.

Les approches expérimentales réalisées par Marie et collaborateurs en 2006, n'ont cependant pas mis en évidence de différence dans l'induction de ces deux isoformes face à une contamination au cadmium. *CgMT2* présentait néanmoins un niveau d'expression basal supérieur à *CgMT1*. *CgMT3* présente des niveaux d'ARN très faibles en comparaison à *CgMT1* et *CgMT2*, et une réponse forte face à une contamination au zinc, indiquant un rôle potentiel dans le développement de l'animal mais pas nécessairement dans sa protection face aux métaux toxiques (Marie et al., 2006b).

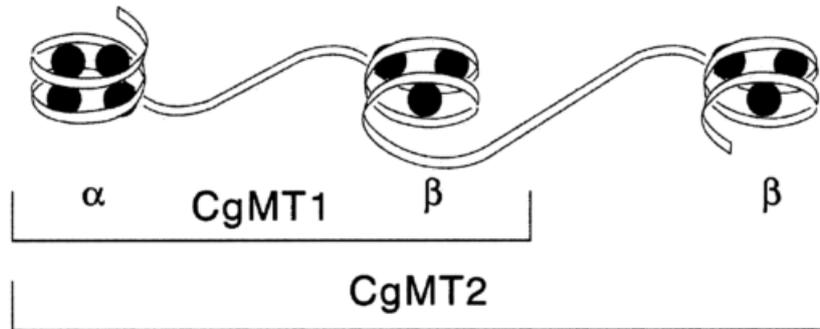


Figure 20 : Structures des isoformes 1 et 2 des MTs chez *C.gigas* (adapté de Tanguy et al., 2001)

4.2.2. Les expressions géniques relatives

L'étude des expressions géniques relatives réalisée dans cette étude fait partie des approches de « transcriptomique ». Ce type d'approche mécanistique connaît un essor particulier depuis les années 90 (Campos et al., 2012), particulièrement chez les bivalves (Li et al., 2013). Elle se base sur l'adaptabilité des organismes face au stress. En cas de contamination, une cellule eucaryote a la possibilité de se « défendre » en produisant une large gamme de protéines assignées à des fonctions de protection très précises. Les besoins en « éléments de protection » de la cellule varient donc en fonction de l'ampleur du stress subit. Selon une approche fonctionnelle de la génomique, l'intensité de transcription d'un gène (nombre de « copies » du gène sous forme d'ARNm) codant pour l'un de ces éléments de défense peut traduire les besoins de la cellule et refléter ainsi les effets du contaminant.

En réalité, la quantité d'ARNm d'un gène dépend de nombreux autres facteurs dont il faut tenir compte dans l'interprétation des résultats. Une régulation peut avoir lieu dans la cellule (Nikinmaa et Rytönen, 2012) à tous les niveaux d'expression d'un gène (transcription, traduction...), en lien avec les facteurs environnementaux (Nikinmaa et Rytönen, 2011) tels que les contaminants chimiques. De plus, certaines inductions peuvent servir à renouveler un stock d'enzyme affecté par un polluant, et pas à augmenter ce stock. Il convient donc d'interpréter les données de transcriptomique avec précautions et de les compléter si possible par une approche de protéomique permettant de faire le lien avec « la fonction » (Campos et al., 2012).

Nous avons ainsi choisi 10 gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse au stress chez l'huître creuse (Tableau 3) : *gpx* (glutathion peroxidase), *gst* (glutathion-s-transferase), *mrx* (multixenobiotic resistance protein), *sod* (superoxyde dismutase cytosolique), *cat* (catalase), *cyp356a1* (cytochrome P450 356A1), *coxI* (sous-unité I de la cytochrome oxydase), *mt1* (isoforme 1 des métallothionéines), *mt2* (isoforme 2 des métallothionéines) et *sodmt* (superoxyde dismutase

mitochondriale). Les fonctions métaboliques associées à l'expression de ces gènes sont décrites dans les paragraphes suivants.

Tableau 3 : Gènes étudiés et séquences des amorces correspondantes

Gène et fonction	Numéro d'accension	Amorce sens	Amorce anti-sens
Métabolisme mitochondrial			
<i>coxI</i>	AB033687	GTGCCAACTGGTATTAAGGTGT	ACACCCGACCCATTGAT
Réponse au stress oxydant			
<i>sod</i>	AJ496219	CCAGAGGATCACGAGAGGC	GCGTTTCCGGTCGTCTT
<i>cat</i>	EF687775.1	GTCGTGCCCTTTACAACC	CGCCCGTCCGAAGTTT
<i>sodmt</i>	EU420128	ACAAAGTCAATCAGTGCCCT	CCATTGCCTCTGCCAGT
<i>gpx</i>	EF692639	ATCGAACGCTGCACCA	AGCTCCGTCGCATTGT
Détoxification			
<i>mt1</i>	AJ242657	TGCTGCTCTGATTCGTGTCC	GGTCCTTTGTTACACGCACTCATT
<i>mt2</i>	AJ297818	TCCGGATGTGGCTGCAAAGTCAAG	GGTCCTTTGTTACACGCACTCATT
<i>mxr</i>	AJ422120	AGGAAGGGCAGTTGAGTG	CGTTGGCCTCCTTAGCG
Métabolisation			
<i>cyp356a1</i>	EF645271	AGGCATAGGGCTCCAC	CTGGTTTCGCGGGTTTCAT
<i>gst</i>	AJ557140	AGGCTACCGAAATGGCTG	CTCTGACTTGTAATAGGCCGC
Reference			
<i>β-act</i>	AB071191	AGTACCCCATTTGAACACGG	TGGCGGGAGCGTTGAA

4.2.2.1. Le métabolisme mitochondrial

La phosphorylation oxydative (ou « respiration cellulaire ») est une cascade réactionnelle localisée au niveau de la membrane interne des mitochondries (Figure 21). Comme précisé précédemment, cette chaîne réactionnelle est l'une des principales sources d'ion superoxyde dans la cellule (cadres rouges). Elle permet *in fine* la production d'énergie sous forme d'Adénine Triphosphate (ATP). La réaction mise en jeu consiste en un transfert d'électrons (flèche bleue) par 4 complexes protéiques à partir d'éléments très réducteurs tels que les cofacteurs Nicotinamide Adénine Dinucléotides (NADH/NAD⁺) ou les Flavine Adénine Dinucléotides (FADH/FAD) vers un oxydant fort : l'oxygène (O₂). Ce transfert permet d'établir un gradient de protons (H⁺) de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale (Hansford, 2002). Ce gradient est à l'origine de la force « proton-motrice » permettant la synthèse d'ATP au niveau du complexe V à partir d'Adénosine Diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi).

La cytochrome c oxydase est l'enzyme transmembranaire constituant le complexe IV de la phosphorylation oxydative. Son rôle clé permet de réduire l'oxygène moléculaire en eau grâce à l'oxydation préalable du cytochrome c (intermédiaire métabolique). Son cœur catalytique contient du cuivre et présente une structure quaternaire formée de 3 sous-unités (Wikström, 2010).

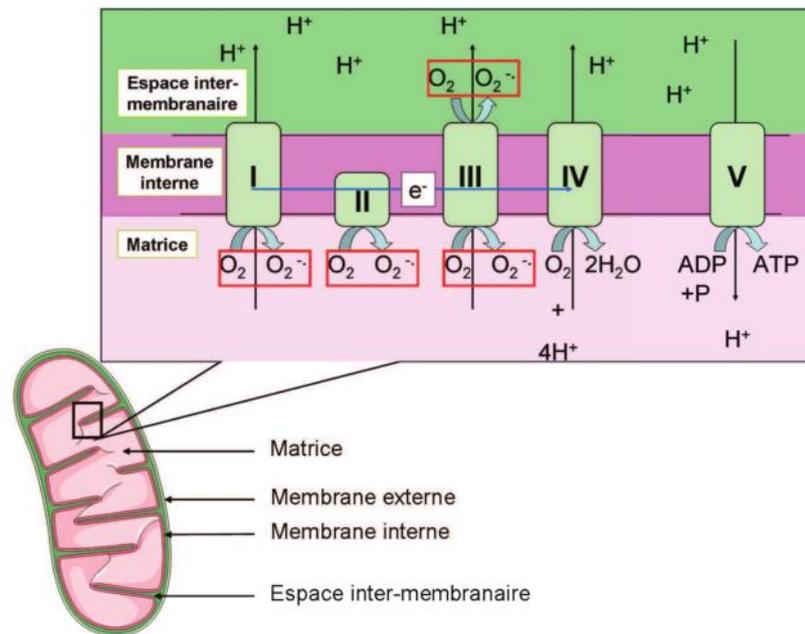


Figure 21 : Représentation schématique de la phosphorylation oxydative (Béguel, 2012)

Le gène choisi pour notre étude est celui de la sous-unité 1 (*coxI*). Elle est la plus large sous-unité de l'enzyme et la plus importante puisqu'elle contient le site catalytique (binucléaire hème-cuivre). De précédents travaux sur des bivalves d'eau douce et marine exposés au cadmium ont montré une surexpression de ce gène face à la toxicité du métal (Achard-Joris et al., 2006), ce qui rend l'étude de ce gène d'autant plus pertinente. Le rôle du complexe IV dans la réponse au stress oxydant demeure cependant sujet à controverse (Srinivasan et Avadhani, 2012). La diminution de son activité a montré entre autres l'accumulation d'intermédiaires métaboliques réactifs produits par les complexes précédents ce qui favorise la production d'EROs. A l'inverse, une augmentation de son activité a également été montrée comme étant à l'origine d'une production accrue d'EROs. D'autres travaux rapportent enfin sa surexpression après 24h d'hypoxie chez *C. gigas* (David et al., 2005).

4.2.2.2. La réponse au stress oxydant

Nous avons regroupé les gènes *sod*, *sodmt*, *gpx* et *cat* puisque les protéines pour lesquelles ils codent ont des actions complémentaires dans la lutte face au stress oxydant. Les voies métaboliques impliquées sont représentées dans la Figure 22. En cas de contamination chimique, la production de ces EROs peut-être accentuée, causant des dommages parfois sévères à la cellule pouvant la mener à l'apoptose. Les premières lignes de défense face à ce type de stress sont les superoxydes dismutases (SOD). Ces enzymes permettent de transformer l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Ce sont des métalloenzymes dont la composition du cœur catalytique est liée à leur localisation subcellulaire : *sod* code donc pour la SOD cytosolique et présente un cœur catalytique à cuivre (Cu) et zinc (Zn) ; *sodmt* code enfin pour la SOD mitochondriale présente dans la matrice mitochondriale et utilisant le manganèse (Mn) dans son cœur catalytique (Fridovich, 2009). Le gène *sod* est induit notamment par l'hypoxie (Sussarellu et al., 2010) chez *C. gigas* ; des surexpressions du gène *sodmt* ont aussi été rapportées face à un stress thermique, une contamination au TBT et au Cd (Park et al., 2009).

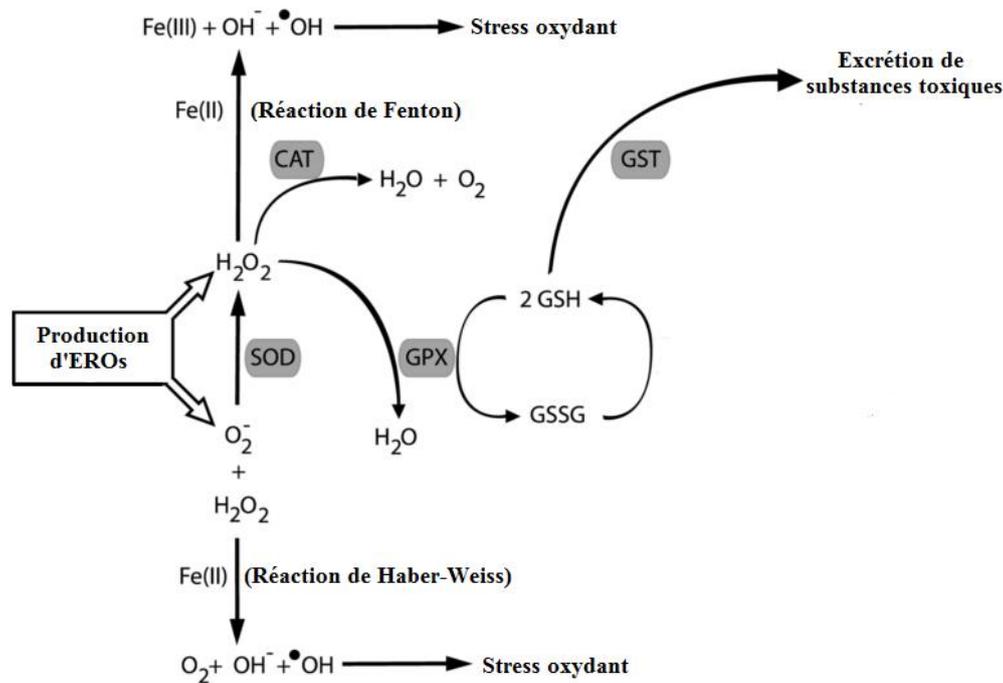


Figure 22 : Représentation schématique des défenses enzymatiques antioxydantes étudiées durant ces travaux (d'après Hermes-Lima, 2004)

Le peroxyde d'hydrogène est ensuite pris en charge par les catalase (CAT) qui le métabolisent en eau et dioxygène. Le gène *gpx* finalement code pour la glutathion peroxydase (GPX). Cette enzyme présente un cœur catalytique comportant du selenium (Se), et permet de réduire le peroxyde d'hydrogène en eau, mais en oxydant deux molécules de glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG). Le glutathion est réduit ultérieurement par l'action de la glutathion réductase (GR). Divers types de stress sont en mesure d'induire l'expression de ces gènes tels que l'hypoxie pour *gpx* (David et al., 2005; Sussarellu et al., 2010) ou le cadmium à 10 $\mu\text{g/L}$ pour *cat* et *gpx* (Jo et al., 2008).

4.2.2.3. La métabolisation des xénobiotiques

Deux gènes impliqués dans la métabolisation des xénobiotiques ont été étudiés durant ces travaux : le gène *cyp356a1* codant pour le cytochrome P450 356A1 (CYP356A1) et le gène *gst* codant pour la glutathion-s-transférase (GST).

CYP356A1 fait partie d'une grande famille d'enzymes : les cytochromes P450. Ces protéines présentent de nombreux rôles dans la physiologie des organismes, et sont principalement connues pour leur activité monooxygénase. Elles catalysent une grande variété de réactions dites de phase I (hydroxylation, époxydation, déalkylation...) leur conférant un rôle majeur dans la métabolisation de certains xénobiotiques lipophiles (HAPs, PCB, dioxines...). Leur action permet de rendre leur substrat plus hydrophile, facilitant de ce fait leur complexation et leur excrétion (Regoli, 2012). Il est cependant important de noter que ces enzymes présentent également un rôle endogène majeur dans le métabolisme de certaines molécules telles que les hormones stéroïdiennes, les eicosanoïdes et les phéromones (Rewitz et al., 2006). Bien que l'activité de l'enzyme ou l'expression du gène puissent être liés à l'exposition aux HAPs chez *C. gigas* (Boutet et al., 2004b), il convient cependant de surveiller en parallèle les processus biologiques liés au métabolisme hormonal afin d'éviter toute

erreur d'interprétation. La séquence génétique utilisée lors de nos études correspond à une sous-famille : CYP356A1, dont l'analyse phylogénétique a montré de grandes similarités avec les membres des sous-familles CYP17 et CYP1 (De Toledo-Silva et al., 2008).

La glutathion-s-transferase est une enzyme impliquée dans les processus de métabolisation dits de phase II (Regoli et Giuliani, 2013). Son rôle (Figure 22) est de conjuguer les xénobiotiques (métabolites de phase I entre autres) et les produits de la peroxydation lipidique au glutathion (Béguel, 2012). Les complexes ainsi formés peuvent ainsi être excrétés par les mécanismes de phase III tels que les « multixenobiotic resistance proteins » (MXR : cf. 4.2.2.4). Les GST font partie d'une large famille de protéines ubiquistes présentes dans de nombreux *phyla* et ont été répertoriées en différentes classes. Des travaux de biologie moléculaire ont par ailleurs caractérisé 4 de ces classes chez *C. gigas* : pi, mu, omega et sigma (Boutet et al., 2004a).

4.2.2.4. La détoxification

Trois gènes impliqués dans les processus de détoxification ont été étudiés durant ces travaux : *mt1*, *mt2* et *mrx*. Les gènes *mt1* et *mt2* codent pour les deux isoformes majoritaires de métallothionéines présentes chez *C. gigas* (détails dans la section précédente : 4.2.1). Comme précisé précédemment les MT peuvent être induites par de nombreux facteurs, souvent en lien avec des conditions de stress global. Ainsi, le promoteur de leur gène possède plusieurs éléments de régulation : (1) les éléments de réponses aux glucocorticoïdes ; (2) des éléments sensibles aux signaux de transduction et activateurs de transcription issus de la voie des cytokines ; (3) des éléments de réponse antioxydants et 4) des éléments de réponse aux métaux activés par les « metal-responsive transcription factors » (MTF-1) saturés en zinc. On comprend donc que ce métal, présent en grande quantité dans la cellule et notamment dans les sites de fixations des MTs présente un rôle majeur dans l'induction de ces protéines. Facilement délogé par d'autres métaux plus affines pour les MTs, le zinc peut se lier aux MTF-1 et induire l'expression du gène des MT (Ruttkay-Nedecky et al., 2013).

Le gène *mrx* code pour la protéine MXR1. Elle fait également partie d'une famille de protéines bien plus large impliquées dans les processus de métabolisation de phase III : les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette). Egalement appelées MDR (multidrug resistance protein) ce sont des protéines transmembranaires permettant de transporter activement (consommation d'ATP) vers l'extérieur de la cellule divers types de xénobiotiques ou des complexes xénobiotique-glutathion (= pompes d'efflux). Ces processus ont été observés pour la première fois dans ces lignées cellulaires tumorales résistantes aux traitements anti-cancéreux (Bard, 2000). Les protéines du système MXR présentent des similitudes avec leur équivalent chez les mammifères : la P-glycoprotéine. Leur présence et leur induction ont déjà été mise en évidence depuis longtemps chez les invertébrés aquatiques tels que *Corbicula fluminea* (Achard et al., 2004) ou *C. gigas* (Minier et al., 2002).

5. Objectifs des travaux de thèse

La protection des milieux aquatiques revêt à l'heure actuelle un caractère prioritaire pour nos sociétés. Le bassin d'Arcachon est particulièrement concerné par cette problématique de par les nombreux services qu'il dispense (habitation, récréation, ostréiculture...), sa richesse écologique importante (zones protégées, réserve du banc d'Arguin, création du parc naturel marin) et la pression anthropique à laquelle il est constamment soumis (urbanisation, agriculture, industrie...).

Les éléments bibliographiques précédemment exposés indiquent en effet que cet écosystème présente une **richesse écologique forte** en lien avec des conditions de vie uniques et une écologie complexe tributaire à la fois des influences océaniques et continentales. Ces caractéristiques naturelles particulières ont permis d'instaurer les premières exploitations ostréicoles, conférant à cette lagune une **importance économique** majeure pour la région avec à la pratique de l'ostréiculture ; cette activité trouve donc ses racines dans une histoire riche et ancienne. *Crassostrea gigas* concentre ainsi des intérêts économiques mais également culturels et patrimoniaux puisqu'elle est devenue au fil du temps un des emblèmes du bassin d'Arcachon.

Ces dernières années ont cependant vu croître la fréquence et l'intensité des **mortalités estivales**, qui concernent de plus en plus le naissain au travers d'épisodes dits de « surmortalité ». De nombreux travaux ont permis d'associer ces événements à un concours de circonstances défavorable à la survie des organismes (températures élevées, période de reproduction, pathogènes opportunistes...). Dans le contexte d'anthropisation croissante de la lagune, il paraît cependant pertinent de s'intéresser au rôle des contaminants chimiques dans l'avènement de ces mortalités.

Un des objectifs majeurs de ces travaux de thèse se positionne dans ce contexte et consiste en **l'amélioration de nos connaissances concernant la réponse de l'huître cultivée face à la pollution rencontrée dans le bassin d'Arcachon**. Les réponses apportées à ce questionnement permettront potentiellement de statuer sur le rôle éventuel des polluants dans les phénomènes de mortalité estivale. Pour répondre à cette problématique, il convient donc de réaliser un **diagnostic de la contamination du bassin d'Arcachon**, au niveau de l'huître (par des opérations de « caging »), mais aussi au niveau des différents compartiments avec lesquels elle interagit (eau, sédiments, particules, nourriture). Ce travail constitue le premier objectif de cette thèse, puisqu'il permet l'identification des polluants majeurs, et donc potentiellement les plus problématiques (HAPs, pesticides...).

La seconde étape de ces travaux est complémentaire puisqu'elle concerne **l'étude spécifique des effets des contaminants majeurs sur l'huître, au travers d'approches expérimentales**. Les organismes étant exposés à des mélanges complexes de polluants dans le milieu naturel, il est pertinent de tester au laboratoire les effets des contaminants identifiés séparément. Cette approche est plus réductionniste, mais permet d'améliorer les connaissances associées à la réponse spécifique de l'huître à certaines classes de polluants ou à certains mélanges ; elle constitue en cela le second objectif de ces travaux.

Intégrer les résultats de ces deux approches complémentaires permettra d'apporter des éléments de réponses pertinents concernant la problématique de notre étude.

Eléments méthodologiques

1.	APPROCHE <i>IN SITU</i>	83
1.1.	Les projets ASCOBAR et OSQUAR	83
1.1.1.	Description des projets.....	83
1.1.2.	Stratégie d'échantillonnage.....	83
1.1.3.	Les caractéristiques des sites d'étude	85
1.1.4.	Traitement des échantillons	86
1.2.	Etude complémentaire en été 2012	87
1.2.1.	Modèles biologiques et stratégie d'échantillonnage	87
1.2.2.	Traitement des échantillons et paramètres étudiés	88
2.	PARAMETRES ETUDIES.....	91
2.1.	Les indices de condition.....	91
2.2.	La quantification des métallothionéines	91
2.2.1.	Saturation au mercure inorganique	91
2.2.2.	Dosage du mercure par spectrométrie d'absorption atomique.....	92
2.3.	Les expressions géniques relatives	93
2.3.1.	Principe de la qPCR en temps réel.....	93
2.3.2.	La quantification relative des niveaux d'expression.....	94
2.3.3.	Réalisation de la qPCR en temps réel	95
2.3.3.1.	Etape 1 : Extraction des ARN totaux	95
2.3.3.2.	Etape 2 : Retro-transcription en ADNc.....	96
2.3.3.3.	Etape 3 : qPCR en temps réel.....	96
2.4.	Les dosages de contaminants.....	98
2.4.1.	Les métaux	98
2.4.1.1.	Traitement des échantillons	98
2.4.1.2.	La spectrométrie d'absorption atomique	98
2.4.1.3.	Dosage du cuivre, du zinc et du cadmium	99
2.4.2.	Les HAPs	101
2.4.2.1.	Traitement préalable des échantillons	101
2.4.2.2.	Note sur l'étalonnage interne.....	101
2.4.2.3.	Extraction et purification des HAPs dans les matrices solides	102
2.4.2.4.	Caractérisation des matrices solides	104
2.4.2.5.	Analyse par GC/MS	104
2.4.2.6.	Contrôle qualité.....	105
2.4.2.7.	Analyse des HAPs de la phase dissoute	109
2.4.3.	Les pesticides	112

1. Approche *in situ*

1.1. Les projets ASCOBAR et OSQUAR

1.1.1. Description des projets

Le projet **ASCOBAR** (Apports Scientifiques face à la problématique COncylicole du Bassin d'ARcachon) s'est déroulé de 2007 à 2009. Il a été initié dans le contexte de crise de la filière ostréicole précédemment décrite. Son objectif principal était l'acquisition de connaissances concernant le fonctionnement du bassin d'Arcachon. Il s'articulait autour de 5 volets de recherche : (1) Apports marins (compréhension de la dynamique des efflorescences toxiques de *Dinophysis*) ; (2) **Apports continentaux** (étude de la contamination chimique et microbiologique de la lagune) ; (3) Huître dans son environnement (écologie de l'huître hors contamination) ; (4) Observation (suivi physico-chimique des eaux) et 5) Microcapteurs (développement d'outils de détection des phycotoxines dans le milieu naturel).

Le projet **OSQUAR** (OStréiculture et QUalité du milieu ; approche intégrée du bassin d'ARcachon) a été mis en place à la suite d'ASCOBAR afin de poursuivre l'effort déjà mené pour améliorer la compréhension du fonctionnement de l'écosystème. Les travaux menés pour ce projet s'articulent autour de 4 volets de recherche : (1) Huîtres et herbiers, de dynamiques écologiques en controverses sociales (écologie de l'huître et des zostères dans la lagune) ; (2) **Usages et Qualité sur un territoire ostréicole** (étude de la contamination chimique du Bassin et des tensions d'usage présentes) ; (3) Suivi de la qualité du milieu (suivi physico-chimique du milieu et construction de l'image de qualité du Bassin) et 4) Regards croisés sur la qualité à l'échelle d'un territoire (approche transdisciplinaire visant à communiquer au sein du projet et vers l'extérieur).

1.1.2. Stratégie d'échantillonnage

L'approche *in-situ* mise en place au cours de ces travaux a été réalisée dans le cadre de la mise en œuvre des projets régions Aquitaine ASCOBAR et OSQUAR. Ces deux programmes se succèdent et présentent les mêmes sites d'échantillonnage mais des cinétiques de prélèvements différentes (Tableau 4).

Deux opérations de transplantation ou « *caging* » ont été menées durant ASCOBAR (2008 – 2009 puis 2009 – 2010) comme durant OSQUAR (2010 – 2011 puis 2011 – 2012). 4 années de suivi ont donc été réalisées pour ces programmes, mais seules les trois dernières seront valorisées dans ce manuscrit.

Chaque opération de « *caging* » a débuté avec la mise en poche d'huîtres diploïdes de 18 mois (T_0) originaires du site de Grand Banc aux alentours de mars - avril (Tableau 4). Ces poches ont ensuite été disposées sur tables ostréicoles au niveau de 6 stations en zone intertidale, de telles sortes que les organismes étudiés soient dans les mêmes conditions que les animaux consommés. Les prélèvements ont systématiquement été réalisés à marée basse lorsque les coefficients de marées étaient assez

importants pour que les différents sites d'études soient exondés. Des sédiments et de l'eau ont systématiquement été prélevés en plus pour la caractérisation chimique du milieu.

Tableau 4 : Chronologie des prélèvements réalisées lors des programmes ASCOBAR et OSQUAR.

	2008	2009	2010	2011	2012
Janvier		T₆ (27 et 28/01/09)	T₆ (19 et 20/01/10)		T₃'' (25 et 26/01/12)
Février				T₃' (21 et 22/02/11)	
Mars	T₀ (12/03/08)	T₇ + T₀ (30 et 31/03/09)	T₇ + T₀' (29 et 30/03/10)		
Avril	T₁ (17, 18 et 23/03/08)			T₀'' (06/04/11)	
Mai		T₁ (11, 12 et 13/05/09)			T₄'' (09 et 10/05/12)
Juin					
Juillet	T₂ (21 et 22/07/08)	T₂ (09/07/09)	T₁' (01/07/10)	T₁'' (18/07/11 et 03/08/11)	
Aout					
Septembre	T₃ (15, 16 et 17/09/08)	T₃ (07 et 08/09/09)			T₅'' (17 et 18/09/12)
Octobre	T₄ (27 et 28/10/08)	T₄ (21 et 22/10/09)	T₂' (11 et 12/10/10)	T₂'' (25 et 26/10/11)	
Novembre					
Décembre	T₅ (15 et 16/12/08)	T₅ (02 et 03/12/09)			

NB : en rouge, prélèvements réalisés dans le cadre d'un stage de master 2 recherche ; en bleu, prélèvements réalisés durant les travaux de thèse.

1.1.3. Les caractéristiques des sites d'étude

Les différents sites d'étude (Figure 23) sont le siège d'une activité ostréicole importante et ont été choisis pour plusieurs raisons en lien avec leur situation géographique : 3 sous influence océanique (Arguin, Bélisaire, Grand Banc) et 3 sous influence continentale (Ile aux oiseaux, le Tès, Eyrac).

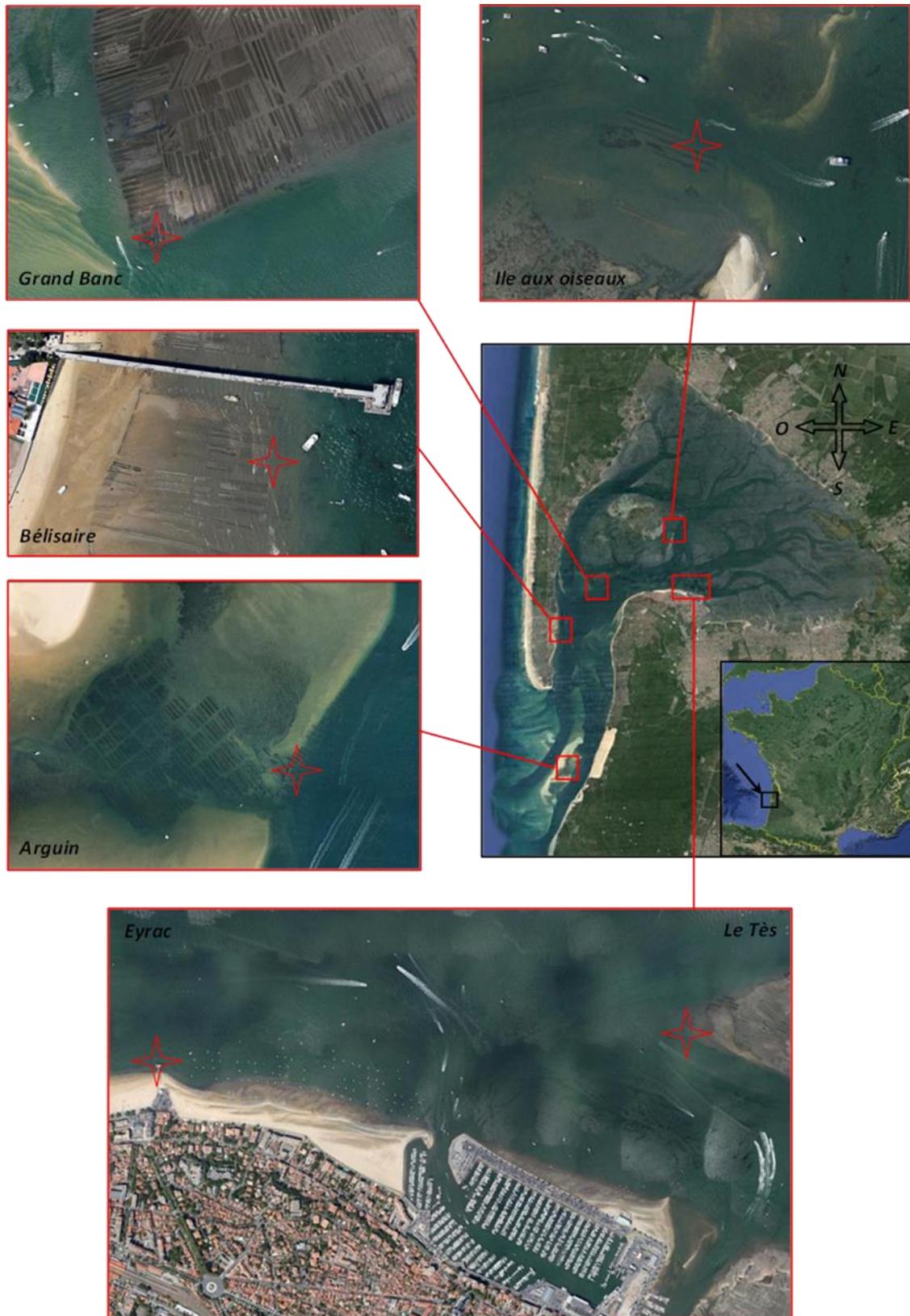


Figure 23 : Sites d'échantillonnage de l'approche *in-situ* (photos : Google Earth)

- **Arguin** en position océanique se situe à la sortie du Bassin d'Arcachon et des passes où il bénéficie de courants importants lors du flot et du jusant. C'est également un site attractif en été, le nautisme de plaisance y est fréquent. Les sédiments y sont sableux.
- **Bélisaire** se situe également dans les passes mais à proximité d'une jetée, les activités nautiques y sont donc régulières. Les sédiments sont de nature vaseuse.
- **Grand Banc** se trouve aussi sous influence océanique, mais ce site est particulièrement réputé pour l'importance des parcs à huîtres qui s'y trouvent et le captage important qui y est observable. Les sédiments y sont sablo-vaseux.
- **L'Île aux oiseaux** en position plus centrale dans la lagune est un lieu de tourisme réputé, siège d'une intense activité nautique. Les sédiments y sont sablo-vaseux.
- **Le Tès** se situe face au port d'Arcachon dans les eaux néritiques moyennes. Les sédiments y sont sablo-vaseux.
- **Eyrac** est localisé au niveau d'Arcachon directement sous une des jetées de la ville à proximité de la plage de baignade. Les sédiments y sont sableux.

1.1.4. Traitement des échantillons

Après leur prélèvement, les huîtres ont été transportées au laboratoire, nettoyées et réparties entre les différents partenaires. Les actions menées sont résumées dans la Figure 24.

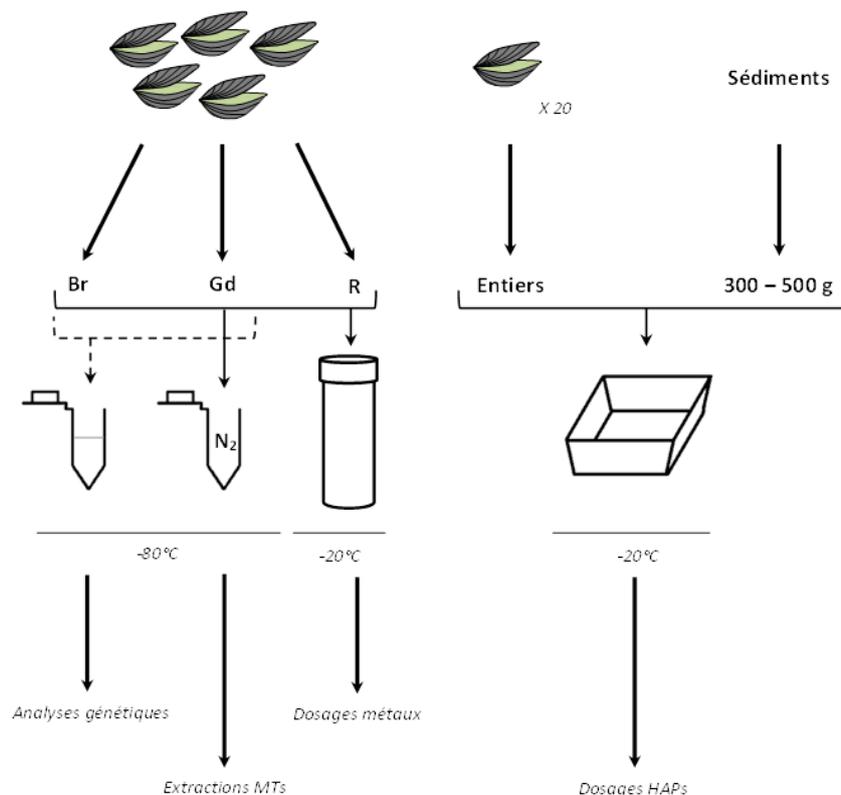


Figure 24 : Schéma récapitulatif du traitement des échantillons après prélèvement

- 5 organismes par temps et par site ont été systématiquement disséqués au laboratoire afin de séparer les **branchies (Br)**, la **glande digestive (Gd)** et le **reste du corps mou (R)**. Après pesée des organes frais, les échantillons étaient subdivisés pour :
 - (1) les analyses de **biologie moléculaire** (branchie et glande digestive) : conservation dans des microtubes en polypropylène RNase-free remplis de RNA-latter puis stockage à -80°C jusqu'à extraction des ARN.
 - (2) le dosage des **métallothionéines (MTs)** (branchies, glande digestive et reste du corps mou) : conservation dans des poches (« whirl-pack ») remplies d'azote (N₂) et stockage à -80°C jusqu'à extraction des MTs.
 - (3) le dosage des **métaux** (branchies, glande digestive et reste du corps mou) : conservés dans des tubes en polypropylène pré-pesés puis stockés à -20°C jusqu'au séchage et à la minéralisation.
- Les coquilles ont été frottées pour être débarrassées de tout élément exogène (vase, parasites, algues) puis mises à l'étuve pour la détermination ultérieure des **indices de condition**.
- 20 huîtres ont été par ailleurs ouvertes et rassemblées dans une barquette en aluminium avant stockage à -20°C pour les futurs dosages de **HAPs** et les mesures de **taux lipidiques**.
- Les sédiments prélevés directement dans la barquette à l'aide d'une cuillère en aluminium ont également été stockés à -20°C pour la quantification des hydrocarbures et la caractérisation du **carbone organique total**.

Les HAPs n'ont pas été mesurés dans l'eau durant ce suivi du fait de la relative stabilité des concentrations mesurées dans le compartiment dissous en 2007 - 2008 (Crespo, 2009) et leur faibles valeurs (de l'ordre de la dizaine de ng par litre).

1.2. Etude complémentaire en été 2012

Des travaux complémentaires centrés sur la période de reproduction ont été réalisés durant l'été 2012. La première année d'étude *in situ* n'ayant pas permis de distinguer les effets de la reproduction de ceux d'une potentielle contamination estivale chez l'huître (principalement au niveau des expressions géniques relatives), il a semblé nécessaire d'approfondir cet aspect par l'utilisation d'animaux présentant un effort de reproduction moins important. Cette étude a donc été réalisée sur la période estivale en utilisant des animaux diploïdes et triploïdes, et en se concentrant sur les HAPs. Les huîtres triploïdes sont en effet connues pour leur investissement énergétique important dans la croissance et leur capacité de reproduction limitée.

1.2.1. Modèles biologiques et stratégie d'échantillonnage

Des huîtres diploïdes et des huîtres triploïdes ont été utilisées durant ces travaux. Elles ont été placées à 18 mois (T₀) selon le même protocole que pour les études de terrain précédemment décrites (1.1.2 : Stratégie d'échantillonnage) en mai 2012 (T₄ OSQUAR année 2) au niveau de stations « emblématiques » de la contamination en HAPs du bassin :

- Arguin (station océanique de référence)

- Ile aux oiseaux (site très touristique et central dans la lagune)
- le Tès (situé face au port d'Arcachon)

Des prélèvements identiques à ceux du suivi réalisé pour les projets régionaux ont été réalisés (huîtres et sédiments) chaque mois (juin, juillet, août) jusqu'en septembre (T₅ OSQUAR année 2).

Tableau 5 : Cinétique des prélèvements pour l'étude in situ de l'été 2012

T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
Ar (09/05/12)	Ar (20/06/12)	Ar (19/07/12)	Ar (20/08/12)	Ar (18/09/12)
Io + Lt (10/05/12)	Io + Lt (27/06/12)	Io + Lt (18/07/12)	Io + Lt (21 + 30/08/12)	Io + Lt (17/09/12)

Des échantillons d'eau ont également été récupérés et filtrés sur des filtres en fibre de verre GF/F (Whatman ; 0,7 µm) afin de déterminer la contamination en HAPs durant la période estivale dans la phase dissoute.

Finalement afin d'évaluer en première approche la contamination du compartiment trophique des huîtres, des lames de verre de 450 cm² ont été placées et maintenues latéralement dans des cages en plastiques et suspendues sous les tables ostréicoles à proximité du sédiment. Les lames ont volontairement été choisies « rayées » et « usées » afin de favoriser la colonisation par des espèces microphytobenthiques remises en suspension et pour le développement de biofilm potentiellement associé à la nutrition des organismes filtreurs. Lors des prélèvements, les lames ont été frottées avec une lame de cutter et les biofilms stockés dans des barquettes en aluminium pour stockage à -20°C avant le dosage des HAPs. Un premier ensemble de lames a été placé sur site en janvier 2012 (T₃ OSQUAR année 2) pour récolte en mai 2012 (T₄ OSQUAR année 2) ; un second a été placé en juillet 2012 et récupéré en septembre 2012 (T₅ OSQUAR année 2).



Figure 25 : Exemple de lames de verres colonisées

1.2.2. Traitement des échantillons et paramètres étudiés

Les mêmes paramètres ont été étudiés durant cette approche complémentaire au niveau des organismes, à l'exception des dosages métalliques et des concentrations en MTs dans les restes du corps mou :

- Croissance (masse du corps mou et longueur de coquille) des huîtres
- Indices de condition des huîtres
- Expressions géniques relatives (branchies et glande digestive)

- Concentration des MTs (branchies, glande digestive)
- Bioaccumulation en HAPs (« pool » de 20 individus entiers)

De plus, les **HAPs** ont été étudiés dans l'**eau** après filtration sur GF/F (Whatman ; 0,7 μm), dans les **sédiments** et dans le **microphytobenthos**. Les stades de développement de la gonade ont également été évalués par observation macroscopique. Le traitement des échantillons biologiques est identique à celui décrit précédemment (dissections, pesées, conservation à -80°C pour les MTs et la génétique). Les échantillons réservés au dosage des HAPs ont également été traités de la même manière que celle décrite pour ASCOBAR et OSQUAR (filtration sur GF/F 0,7 μ et stockage à -20°C pour l'eau).

Résumé des paramètres étudiés durant les diverses approches terrain

Tableau 6 : Résumé des paramètres mesurés et présentés dans le manuscrit pour l'approche *in-situ*

Programme/Projet		ASCO. 2	OSQ. 1	OSQ. 2	Été 2012
Fréquence échantillonnage		45 j.	90 j.	90 j.	30 j.
Paramètres physiologiques					
M	<i>OE</i>	×	×	×	×
L	<i>OE</i>	×	×	×	×
IC	<i>OE</i>	×	×	×	×
St. Repro	<i>OE</i>				×
Tx lip.	<i>OE * 20</i>	×	×	×	×
Biomarqueurs moléculaires					
MTs	<i>Br</i>	×	×	×	×
	<i>Gd</i>	×	×	×	×
	<i>R</i>	×	×	×	
Exp. Gen.	<i>Br</i>	×	×	×	×
	<i>Gd</i>	×	×	×	×
Bioaccumulation des contaminants					
Cu	<i>Br</i>	×	×	×	
	<i>Gd</i>	×	×	×	
	<i>R</i>	×	×	×	
Zn	<i>Br</i>	×	×	×	
	<i>Gd</i>	×	×	×	
	<i>R</i>	×	×	×	
Cd	<i>Br</i>	×	×	×	
	<i>Gd</i>	×	×	×	
	<i>R</i>	×	×	×	
HAPs	<i>OE * 20</i>	×	×	×	×
	<i>Sed</i>	×	×	×	×
	<i>μphyto</i>				×
	<i>Eau</i>				×

ASCO. : ASCOBAR ; OSQ. : OSQUAR ; M : masse fraîche ; L : longueur de coquille ; IC : indice de condition ; St. Repro : stade de maturation des gonades ; Tx. Lip. : taux lipidiques ; MTs : métallothionéines ; Exp. Gen. : expressions géniques relatives ; Br. : branchies ; Gd. : glandes digestives ; R. : restes du corps mou ; OE : organisme entier

NB : Les HAPs dans les sédiments ont été mesurés tous les 90 jours durant ASCOBAR. Les sédiments de la station Eyrac n'ont pas été analysés en HAPs durant ce programme. Le gène de la catalase n'a pas non plus été étudié durant ce programme. Les tests comètes et les dosages hormonaux (oestradiol et testostérone) ont également été réalisés par les partenaires du projet sur les huîtres prélevées mais ne seront pas exploités dans ce manuscrit (sauf les cassures à l'ADN en Été 2012).

2. Paramètres étudiés

2.1. Les indices de condition

Ce paramètre est représentatif de « l'état de santé » de l'animal. C'est un rapport qui rend compte du niveau de remplissage de la coquille. Il permet ainsi de détecter des variations de masse chez l'animal, comme un amaigrissement lié à l'absence de nourriture, le parasitisme ou les émissions gamétiques. Plusieurs indices de conditions existent (Salvo, 2010) impliquant les mesures de masses sèches ou fraîches des organismes. Les plus sensibles aux variations impliquent le plus souvent les masses sèches, mais dans un souci de reproductibilité (par rapport aux actions menées en première année du programme ASCOBAR) nous avons choisi d'utiliser l'indice de condition (IC) suivant :

$$IC = \frac{\text{masse}_{\text{corps mou égoutté}}}{\text{masse}_{\text{coquille}}} \times 100$$

La masse du corps mou égoutté est obtenue après dissection en additionnant les masses des branchies, glandes digestives et restes du corps mou. Les coquilles sont ensuite frottées et nettoyées, mises à l'étuve pour séchage et mesurées/pesées. Le calcul de cet indice nous donne également l'occasion de récupérer les données de croissances (masse du corps mou et longueur de coquille) qui seront présentées par la suite.

2.2. La quantification des métallothionéines

2.2.1. Saturation au mercure inorganique

Cette méthode proposée par Baudrimont et al., (1997) permet la quantification indirecte des MTs par dosage du mercure qu'elles séquestrent (Figure 26). Dans un premier temps, 50 à 150 mg de branchies, glande digestive ou reste du corps mou sont broyés dans 1 mL de tampon Tris-HCl 25 mM (pH 7,2 à 20°C). Le broyage est réalisé sur glace et sous atmosphère d'azote à l'aide d'un broyeur mécanique (ou homogénéisateur de tissu : T10 – IKA Ultra-Turrax). Une centrifugation à 20000 g d'une heure à 4°C est réalisée en suivant afin de séparer les débris cellulaires (culot) des contenus cellulaires contenant les protéines d'intérêt.

Les surnageants sont ensuite prélevés en duplicat pour chaque échantillon (2 fois 200 µL). Trois blancs sont alors préparés (3 fois 200 µL de tampon Tris-HCl 25 mM) ainsi que trois échantillons de référence (3 fois 200 µL d'une solution diluée à 10 µg MT/mL de MTs de foie de lapin (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri)).

La saturation au mercure inorganique est alors réalisée par ajout dans chaque tube de 200 µL d'une solution de mercure acidifiée (HgCl₂ à 10 mg/L et 10% d'acide trichloracétique). L'acidité permet de faire précipiter les protéines de haut poids moléculaire et le mercure ajouté en excès permet de saturer les sites de fixations des MTs puisque ce métal présente une affinité maximale pour ces protéines. Un passage au vortex permet alors d'homogénéiser les échantillons. Un repos de 10 minutes est respecté afin d'assurer la saturation des MTs par le mercure.

Le métal en excès (non fixé aux MTs) est ensuite supprimé des échantillons par l'utilisation d'une solution d'hémoglobine. Cette protéine présente une forte affinité pour le mercure et permet de récupérer le métal en excès sans décrocher celui déjà séquestré par les MTs. Cette solution est donc préparée en mélangeant 40 mL de tampon Tris-HCl 30 mM à 1 g d'hémoglobine porcine lyophilisée (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri). 400 μ L sont alors ajoutés à chaque échantillon. Une dernière centrifugation de 20 minutes à 20000 g est finalement réalisée pour séparer l'hémoglobine chargée en mercure (culot) des extraits cellulaires saturés (surnageant). Cette opération est réalisée rapidement pour minimiser le temps de contact entre l'hémoglobine et les MTs saturés. Les surnageants sont prélevés intégralement, pesés dans des microtubes et stockés à 4°C jusqu'au dosage du mercure.

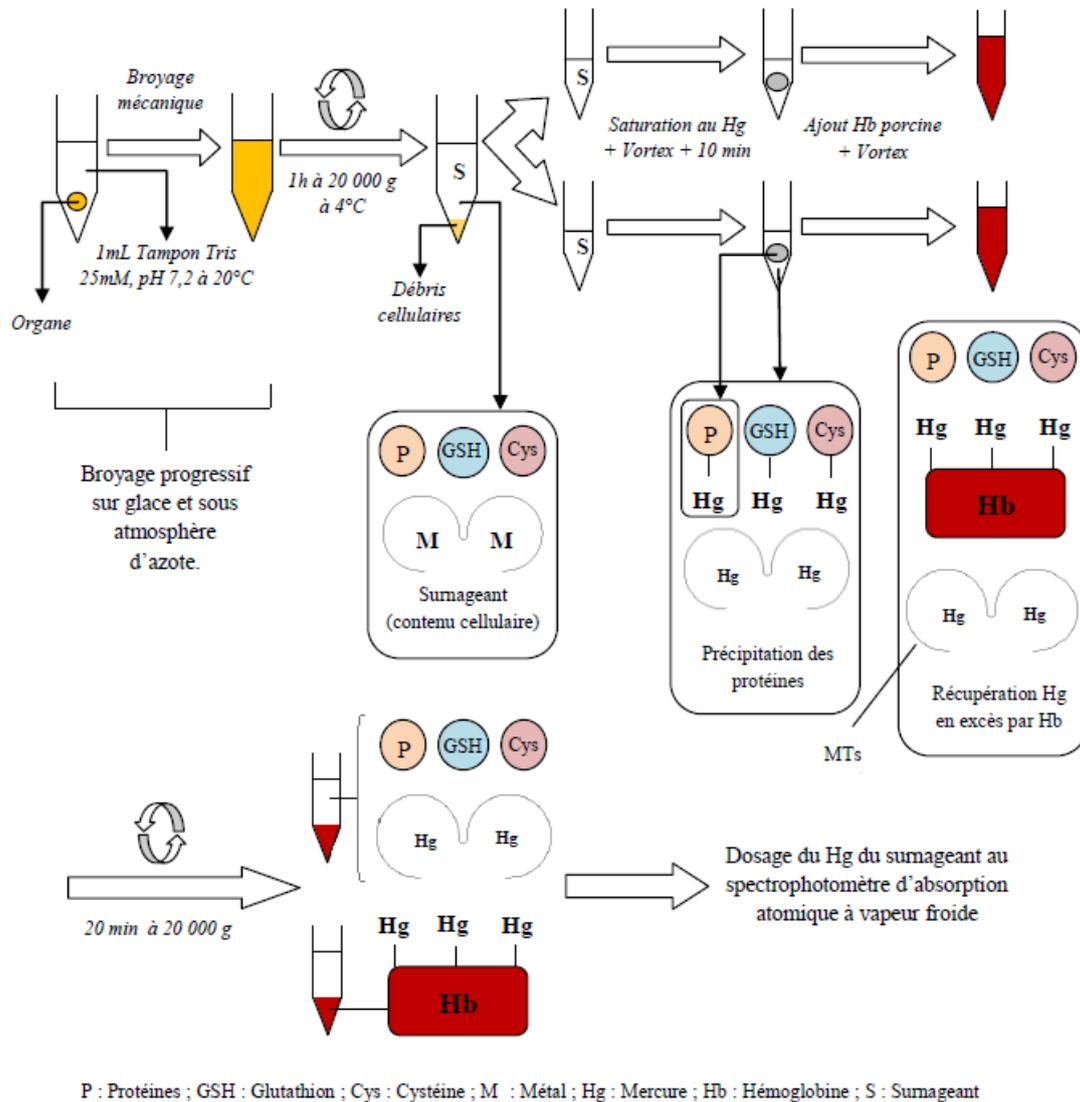


Figure 26 : Principe d'extraction des métallothionéines

2.2.2. Dosage du mercure par spectrométrie d'absorption atomique

Il est réalisé par spectrophotométrie d'absorption atomique sous flux d'oxygène (LECO AMA 254, ALTEC, Prague, République Tchèque ; LD = 0,1 ng – 500 ng). 100 μ L des surnageants issus de l'étape précédente sont déposés dans des nacelles en nickel disposées sur le carrousel de la machine. Des échantillons certifiés sont disposés régulièrement sur le carrousel (50 mg de Tort-2 - Lobster

Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals – National Research Council Canada) afin de calculer l'efficacité de la machine (sur/sous-évaluation des valeurs par l'appareil). Les résultats sont exprimés en nmoles de sites de fixation de Hg par gramme de poids frais (nmols Hg/g, pf).

2.3. Les expressions géniques relatives

La technique employée dans le cadre de nos travaux est aussi l'une des plus utilisée : la Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) en temps réel. L'emploi de cette technique implique au préalable de connaître les séquences nucléotidiques des gènes codant pour les protéines d'intérêt. De nombreux travaux ont permis de séquencer ce type de gènes chez l'huître creuse au fil du temps. Il est cependant intéressant de noter que le génome entier de *C. gigas* a finalement été séquencé (Zhang et al., 2012), ce qui élargit largement le spectre d'étude chez ce modèle au niveau moléculaire.

2.3.1. Principe de la qPCR en temps réel

La PCR est une technique permettant « d'amplifier » (multiplier) une séquence génique ciblée à l'aide d'une enzyme : La *Taq* (*Thermus aquaticus*) polymérase. Cette protéine issue d'une bactérie vivant dans des eaux très chaudes présente la propriété de ne pas se dénaturer à haute température, ce qui lui permet de subir les cycles de dénaturations de l'ADN à 95°C sans cesser son activité (Figure 27). Elle n'amplifie cependant que l'ADN, ce qui implique deux étapes préliminaires : (1) l'extraction des ARN messagers (ARNm) totaux de l'échantillon et (2) leur rétro-transcription en ADN complémentaire (ADNc).

Le mélange réactionnel de base de la PCR comprend donc schématiquement : (1) la *Taq* polymérase, (2) les ADNc de l'échantillon, (3) des bases azotées permettant la synthèse d'ADN par la *Taq*, (4) un tampon d'activité enrichi en agent intercalant favorisant l'action de la *Taq* et (5) des amorces spécifiques des gènes d'intérêt.

La réaction de PCR est constituée d'une succession de 40 cycles identiques présentant chacun trois paliers thermiques (Figure 27). Le premier palier à 95°C est la dénaturation : elle permet de s'assurer que tous les ADNc de l'échantillon sont sous forme de simple brin (1b). Le second palier de 30 secondes à 55°C est l'hybridation : elle permet la fixation des amorces sens et anti-sens aux ADNc afin que la *Taq* polymérase ne synthétise que « le gène » désiré. L'élongation dure finalement 30 secondes à 72°C et correspond à l'étape de synthèse d'ADN par la *Taq*.

La particularité de la PCR « en temps réel » est la présence dans le mélange réactionnel d'un agent intercalant (SYBR Green I). Cette molécule est un fluorochrome possédant la capacité d'émettre une fluorescence à 530 nm (vert) lorsqu'il est intercalé entre les brins d'ADN suite à l'élongation. L'intensité du signal de fluorescence est donc directement proportionnelle à la quantité d'ADN double brin synthétisé (ou amplicons).

A chaque fin de cycle (dénaturation + hybridation + élongation), le thermocycleur mesure donc la fluorescence de l'échantillon et la reporte sur un graphique. Puisque chaque cycle multiplie par 2 la quantité initiale d'ADN, on peut informatiquement déterminer le « Cycle treshold » (C_t). Ce C_t

correspond au nombre de cycles nécessaires pour que la réaction de PCR entre en phase exponentielle (dépassement du « treshold » ou seuil).

De façon logique, le C_t dépend de la quantité d'ADNc introduit dans le mélange réactionnel et donc de la quantité d'ARNm extraits préalablement. Typiquement, plus la quantité extraite d'ARNm du gène ciblé est importante, plus la quantité d'ADNc correspondant sera grande et donc plus le C_t sera faible.

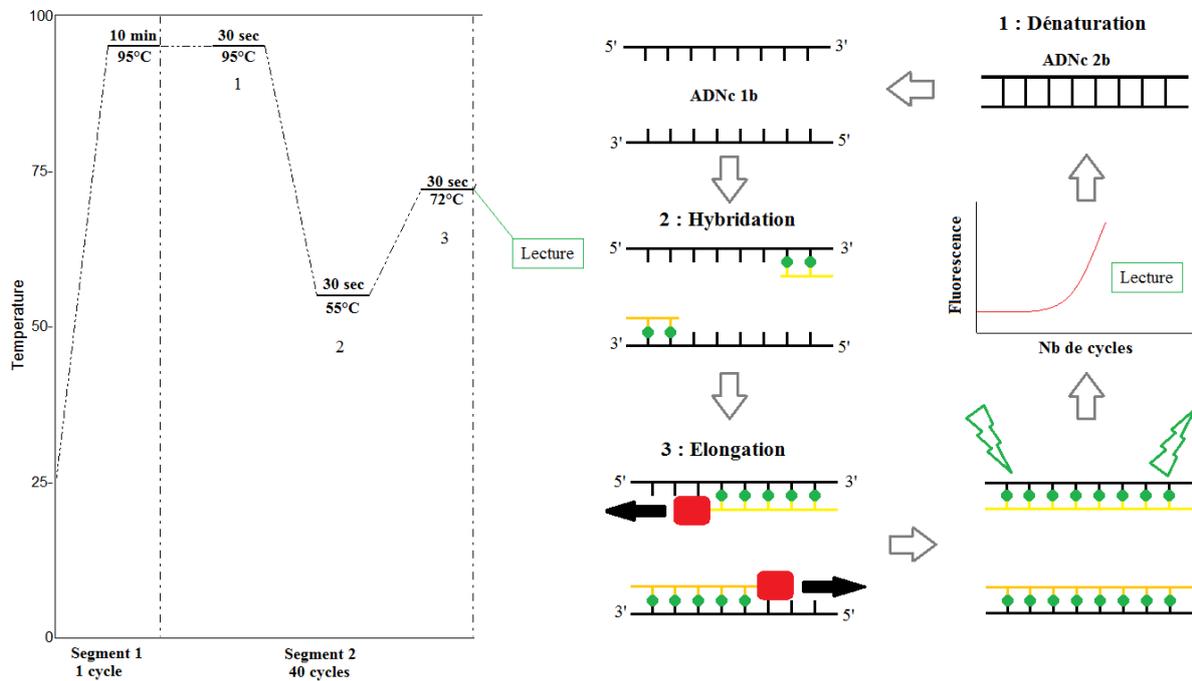


Figure 27 : Principe général de la qPCR SYBR Green

2.3.2. La quantification relative des niveaux d'expression

La méthode de quantification relative de l'ARNm utilisée dans notre étude se base sur les travaux de Livak and Schmittgen (2001) autrement appelée « méthode du ΔC_t ». Elle permet d'évaluer l'expression d'un gène en comparant son niveau d'expression à celui d'un gène de référence (« housekeeping gene ») dont l'expression est très stable et ne présente pas de variation en fonction des traitements expérimentaux appliqués.

Les variations d'expression des gènes étudiés ici ont donc été évaluées relativement à l'expression du gène de la β -actine. Ce gène code pour une protéine du cytosquelette exprimée dans la plupart des types cellulaires (Bustin, 2000). Il est l'un des premiers à avoir été utilisé ainsi chez l'huître creuse et l'est toujours aujourd'hui (Park et al., 2009; Zhang et al., 2011). De précédents travaux réalisés sur des stades adultes lors d'études de terrains similaires aux nôtres, ont par ailleurs montré la pertinence de ce choix (Farcy et al., 2007). Dans un souci de représentativité et afin de pouvoir comparer nos travaux sur le terrain à ceux réalisés en laboratoire, la β -actine a donc été employée systématiquement comme gène de référence durant nos travaux.

La méthode de calcul de l'expression génique relative d'un gène ciblé est :

$$2^{-\Delta C_t} \text{ avec } \Delta C_t = C_{t_{\text{gène ciblé}}} - C_{t_{\text{gène de référence}}}$$

Dans le cas d'approches expérimentales nécessitant la comparaison de conditions exposées aux polluants à des conditions contrôle non exposées, un facteur d'induction peut être calculé tel-que :

$$\text{Facteur d'induction} = \frac{2^{-\Delta Ct_{\text{contaminé}}}}{2^{-\Delta Ct_{\text{contrôle}}}}$$

2.3.3. Réalisation de la qPCR en temps réel

2.3.3.1. Etape 1 : Extraction des ARN totaux

La première étape consiste à extraire les ARN de la matrice biologique à l'aide d'un kit « Absolutely RNA Miniprep Kit » (Agilent, La Jolla, California). Pour cela, 20 à 40 mg de tissus (branchies ou glande digestive) sont récupérés, décongelés et broyés dans un tampon de lyse à l'aide d'un potter en polypropylène afin de libérer les contenus cellulaires. Ce tampon contient du thiocyanate de guanidine (agent chaotropique) permettant la dénaturation des protéines telles que les RNase ou les DNase et favorise la lyse des membranes. Il permet ainsi l'extraction d'acides nucléiques tout en préservant leur intégrité. L'ajout de β -mercaptoéthanol permet de soutenir l'action de dénaturation des RNase (réduction des ponts disulfures) pour protéger les ARN extraits.

Les broyats sont ensuite préfiltrés sur des micro-colonnes par centrifugation durant 5 minutes à vitesse maximale (13000 g). Après récupération dans des microtubes RNase free, les contenus cellulaires sont soumis à une étape de déprotéinisation au phénol-chloroforme (phénol:chloroforme:alcool isoamylique - 25:24:1 ; Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri). 600 μ L de phénol-chloroforme (vol 1:1) sont ajoutés aux filtrats, puis l'échantillon est homogénéisé au vortex et centrifugé 5 minutes à vitesse maximale. Cette étape correspond à une « extraction liquide-liquide » durant laquelle les composants cellulaires se partitionneront entre : la phase organique phénolée (protéines hydrophobes, lipides etc...) et la phase aqueuse (composés polaires tels que les acides nucléiques).

La phase aqueuse est récupérée à la pipette dans des microtubes et traitée avec un volume équivalent d'éthanol 75% (Ethanol absolu + Eau ultra-pure traitée DEPC). Ce mélange peut ensuite être déposé sur une colonne d'affinité permettant de retenir les acides nucléiques. Après centrifugation 1 minute à 13000 g, les filtrats sont jetés et les colonnes sont soumises à une traitement à la DNase I : (1) 600 μ L d'une solution tampon faiblement concentrée en sels sont déposés sur les micro-colonnes pour réaliser un premier lavage par centrifugation 1 minute à 13000 g ; (2) après séchage des colonnes 1 minute à 13000 g, 55 μ L d'une solution de DNase (5 μ L DNase I reconstituée [1 U/ μ L] + 50 μ L Tampon d'activité) sont déposés sur les colonnes ; (3) les échantillons sont alors incubés 15 minutes à 37°C pour permettre la dégradation de l'ADN ; (4) un lavage avec 600 μ L de solution tampon fortement concentrée en sels est réalisé pour éliminer la DNase I et les fragments d'ADN ; (5) un dernier lavage avec 300 μ L de solution tampon faiblement concentrée en sels est appliqué.

Une dernière centrifugation de 2 minutes à 13000 g permet de sécher la colonne contenant les ARN. Elle est alors placée dans un microtube final, et 30 μ L de tampon d'élution préalablement chauffé à 60°C sont appliqués. Après 2 minutes d'incubation, une dernière centrifugation 1 minute à 13000 g permet de collecter les ARN purifiés, qui seront stockés à -80°C jusqu'à leur rétrotranscription.

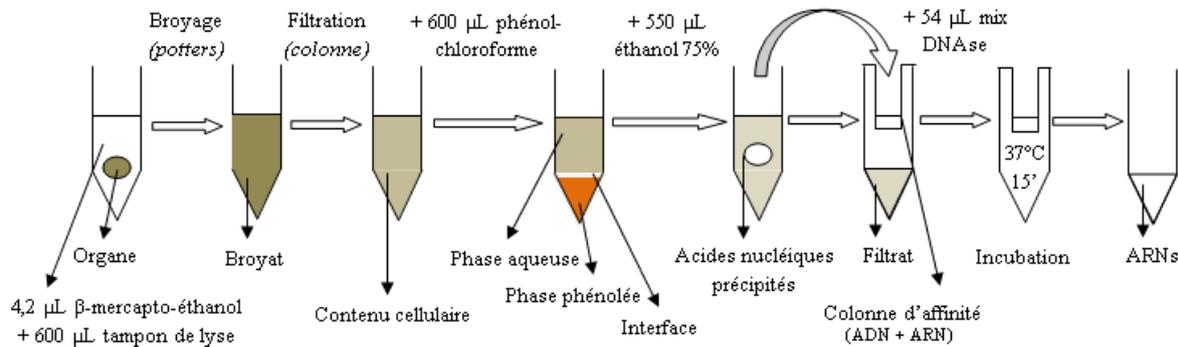


Figure 28 : Schéma des étapes successives de l'extraction d'ARN

2.3.3.2. Etape 2 : Retro-transcription en ADNc

Cette étape permet de transformer les ARNs extraits préalablement en l'ADNc, utilisables lors de la qPCR. Elle est réalisée à l'aide du kit « AffinityScript cDNA synthesis Kit » (Agilent, La Jolla, California) selon les instructions du fournisseur. Dans un premier temps 14 µL d'ARNs (3 à 5 µg) sont mélangés à 1 µL d'oligo-dT (0,5 µg/µL), 1 µL d'hexanucléotides (0,1 µg/µL), 0,8 µL de dNTP (25 mM chacun) et à 2 µL de tampon d'activité 10X. Ce mix est passé 5 minutes à 65°C afin de linéariser les ARNs. En refroidissant, les amorces se fixent à la matrice. Ce n'est qu'après que la transcriptase inverse ou RT pour reverse-transcriptase (1 µL à 1 U/µL) et la RNase-block (0,5 µL à 40 U/µL) sont ajoutées. Le mélange restera 1h au thermocycleur à 42°C pour permettre la retro-transcription enzymatique. Les ADNc obtenus seront stockés à -20°C en attendant d'être utilisés pour la qPCR.

2.3.3.3. Etape 3 : qPCR en temps réel

Avant tout chose, des mélanges individuels d'amorces sont réalisés pour chaque gène (= « mix amorces ») en mélangeant 2 µL d'amorce sens (100 µM) + 2 µL d'amorce anti-sens (100 µM) + 96 µL d'eau ultra-pure auto-clavée (concentration finale de chaque amorce : 2 µM). Les amorces sont commandées individuellement au préalable chez un fournisseur (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri) à la concentration désirée et stockées à -20°C. Le mélange réactionnel est réalisé à l'aide du kit « Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix » (Agilent, La Jolla, California) dans des plaques 96 puits.

Dans chaque puits sont déposés :

- 1 µL d'ADNc
- 2 µL de mix amorces
- 17 µL de mélange réactionnel

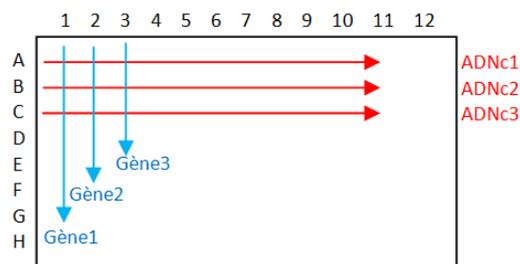


Figure 29 : Modèle de plaque 96 puits réalisé en qPCR

Le mélange réactionnel consiste en un mélange d'eau ultra-pure autoclavée (7 µL par puits) et de tampon 2X (ou « Master Mix » à raison de 10 µL par puits). Le Master Mix est une solution préparée par le fournisseur comprenant les éléments nécessaires à la réaction de PCR : (1) la *Taq* polymérase ; (2) les dNTP ; (3) du Mg^{2+} pour l'action de l'enzyme ; (4) le SYBR Green I ; (5) un tampon d'activité. Un « No Template Control » (NTC) est réalisé pour chaque plaque afin de s'assurer de l'absence d'ADN dans l'eau utilisée pour la réalisation des mélanges réactionnels. Ce contrôle est constitué des

mêmes réactifs que les autres puits, avec l'amorce de l'actine et 1 μ L d'eau ultra-pure à la place de l'échantillon.

La réaction de PCR a été réalisée dans un thermocycleur Mx3000P (Agilent, La Jolla, California). Le profil thermique est identique à celui décrit précédemment : 1 cycle de 10 min at 95°C (activation de l'enzyme) puis 40 cycles d'amplification composés chacun de 30 secondes à 95°C (dénaturation), 30 secondes à 55°C (hybridation) et 30 secondes à 72°C (élongation). Les C_t ont été obtenus par le logiciel MxPro – Mx3000P (Agilent, La Jolla, California).

La spécificité d'amplification des gènes d'intérêt est systématiquement vérifiée en fin de réaction par l'étude des courbes de fusion. Chaque amplicon présente en effet une composition spécifique en bases azotées (ATCG). Cette composition conditionne la température de dénaturation (température de fusion ou T_m) du double brin d'ADN. Ainsi, après les 40 cycles d'amplifications précédemment décrits, une dernière étape de chauffage est réalisée par l'appareil qui va enregistrer en continu la fluorescence entre 65°C et 95°C. Les températures auxquelles sont enregistrées des chutes soudaines de fluorescence correspondent aux seuils de dénaturation des amplicons : en se séparant, les doubles brins libèrent le SYBR Green I qui n'émet plus de fluorescence.

2.4. Les dosages de contaminants

2.4.1. Les métaux

Trois métaux ont été dosés durant ces travaux : le cadmium (Cd), le cuivre (Cu) et le zinc (Zn). Ils ont été dosés durant l'approche *in-situ* ASCOBAR – OSQUAR dans les matrices biologiques uniquement, en séparant les différents organes d'intérêts (branchie, glande digestive et restes du corps mou). Ces dosages n'ont pas été réalisés durant l'approche de terrain complémentaire de l'été 2012 qui était principalement focalisée sur les HAPs. Le cuivre a également été quantifié dans ces trois organes pendant l'expérimentation réalisée en 2012 concernant la réponse de *C. gigas* face aux produits phytosanitaires.

2.4.1.1. Traitement des échantillons

De manière générale, après dissection, les échantillons étaient systématiquement stockés dans des tubes en polypropylène tarés, puis pesés et stockés à -20°C. Quelques jours avant les analyses, les échantillons étaient décongelés et placés à l'étuve 48h à 48°C pour supprimer l'eau. De cette façon, les résultats de bioaccumulation métallique ont toujours pu être exprimés par rapport à la masse sèche, ce qui permet de s'affranchir des variations de teneurs en eau (variabilité de l'égouttage des organes, variations dues à la congélation etc...). La masse sèche était calculée comme le poids total (tube + organe séché) auquel était soustrait le poids du tube vide.

Suite au séchage, les échantillons ont subi une digestion acide ou minéralisation, afin d'obtenir une matrice liquide adéquate pour les appareillages analytiques, mais aussi pour solubiliser et stabiliser les métaux d'intérêt. Cette étape a été réalisée par l'ajout dans les tubes de 3 mL d'acide nitrique NO₃ à 65% (Merck, Darmstadt, Germany) suivi par un chauffage à 100°C pendant 3 heures. Après digestion, 15 mL d'eau ultra-pure étaient ajoutés afin de diluer le digestat et d'obtenir une concentration en acide entre 2 et 20%. Les dosages pouvaient être réalisés en suivant, ou plus tard, auquel cas les échantillons étaient conservés en chambre froide à 4°C.

Chaque lot d'échantillon minéralisé était accompagné de la digestion de 3 « blancs de minéralisation » (acide seul) et de 4 échantillons certifiés : deux fois 20 – 50 mg de poudre de Tort-2 (Lobster Hepatopancreas Reference Material for Trace Metals – National Research Council Canada, Ottawa, Canada) et deux fois 20 – 50 mg de poudre de Dolt-4 (Dogfish Liver Certified Reference Material for Trace Metals – National Research Council Canada, Ottawa, Canada).

L'analyse de ces lots d'échantillons était systématiquement réalisée avec celle de leurs blancs et de leurs certifiés pour vérifier la précision de l'appareil de mesure.

2.4.1.2. La spectrométrie d'absorption atomique

Le principe de dosage employé pour la quantification des métaux est « l'absorption atomique ». Elle se base sur la capacité des atomes métalliques à absorber des rayonnements de la même longueur d'onde que celle qu'ils émettent.

L'échantillon liquide dans lequel les métaux sont solubilisés peut-être nébulisé (changé en gouttelettes microscopiques) et atomisé dans une flamme ou un plasma ou simplement déposé en faible quantité

dans un four à graphite puis atomisé. Cette étape d'atomisation est commune à toutes les techniques employées car elle permet par transfert d'énergie de faire passer les éléments métalliques sous leur forme fondamentale afin qu'ils soient en mesure d'absorber les rayonnements émis par l'appareil.

La cellule où se produit l'atomisation est un atomiseur et sa nature varie d'une technique à l'autre. Dans le cas d'une atomisation par flamme (spectrométrie d'absorption atomique à flamme - SAAF), les éléments recherchés sont atomisés dans un brûleur par une flamme issue de l'ignition d'un mélange air/acétylène ; dans le cas d'un four à graphite (spectrométrie d'absorption atomique électrothermique – SAAE) ils sont atomisés dans un four cylindrique électrothermique (2,5 cm * 0,6 cm).

Un rayonnement est alors émis à la longueur d'onde spécifique de l'élément recherché (lampe à cathode creuse ou à décharge). Les atomes dans leur état fondamental absorbent une partie de l'intensité lumineuse émise. Le rapport entre les intensités incidentes et transmises (mesurée par un détecteur) permet de calculer une absorbance qui selon la loi de Beer-Lambert est directement proportionnelle à la concentration en élément « absorbant » (= le métal recherché).

$$A = \log \frac{I_0}{I} = k.l.c$$

Avec I_0 : intensité de la lumière incidente

I : intensité de la lumière transmise

k : coefficient d'absorption de l'espèce absorbante

l : longueur de la zone présentant l'espèce absorbante (longueur flamme/four)

c : concentration de l'espèce absorbante

2.4.1.3. Dosage du cuivre, du zinc et du cadmium

La quantification des composés se fait par étalonnage externe. Pour chaque série d'échantillons, une série de solutions étalons de concentrations connues et croissantes est passée au préalable dans la machine afin de calibrer le signal reçu par rapport aux concentrations correspondantes. La linéarité de la réponse est systématiquement testée informatiquement et la séquence ne démarre que dans des conditions de dosage optimales, c'est-à-dire avec une corrélation signal / concentration forte ($R^2 > 0,99$).

Le cuivre et le zinc ont été dosés par spectrométrie d'absorption atomique à la flamme grâce au spectrophotomètre d'absorption atomique Varian SpectrAA 220 FS (Varian, Palo Alto, Californie). Les limites de détection pour les éléments concernés et les longueurs d'onde étudiées pour les deux composés sont décrites dans la Figure 30. Cet appareil présente par ailleurs l'intérêt de corriger le bruit de fond grâce à une lampe à deutérium dont le spectre d'émission n'est pas absorbé par les analytes recherchés. Le signal obtenu dépendant à la fois du bruit de fond et de la présence du métal, on peut lui retrancher l'absorbance mesurée par la lampe à deutérium et corriger ainsi le signal.

Le cadmium, bien moins présent dans les milieux naturels et les organismes, a dû être mesuré avec un spectrophotomètre d'absorption atomique à atomisation électrothermique (Solaar M6, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts). Le temps de résidence de l'échantillon (20 μ L) dans le four est supérieur à celui passé dans la flamme. Un flux d'argon préserve par ailleurs le four des effets de

l'oxygène aux hautes températures. Les limites de détection sont plus basses pour le cadmium (100 ng/L). L'utilisation de modificateurs de matrice tels que le nitrate de palladium et le nitrate de magnésium permet par ailleurs de stabiliser le cadmium sous forme complexée. Les températures d'atomisation peuvent donc être augmentées sans risquer de volatiliser une partie de l'analyte recherché, tout en détruisant la matrice interférente (matière organique, acide etc...).

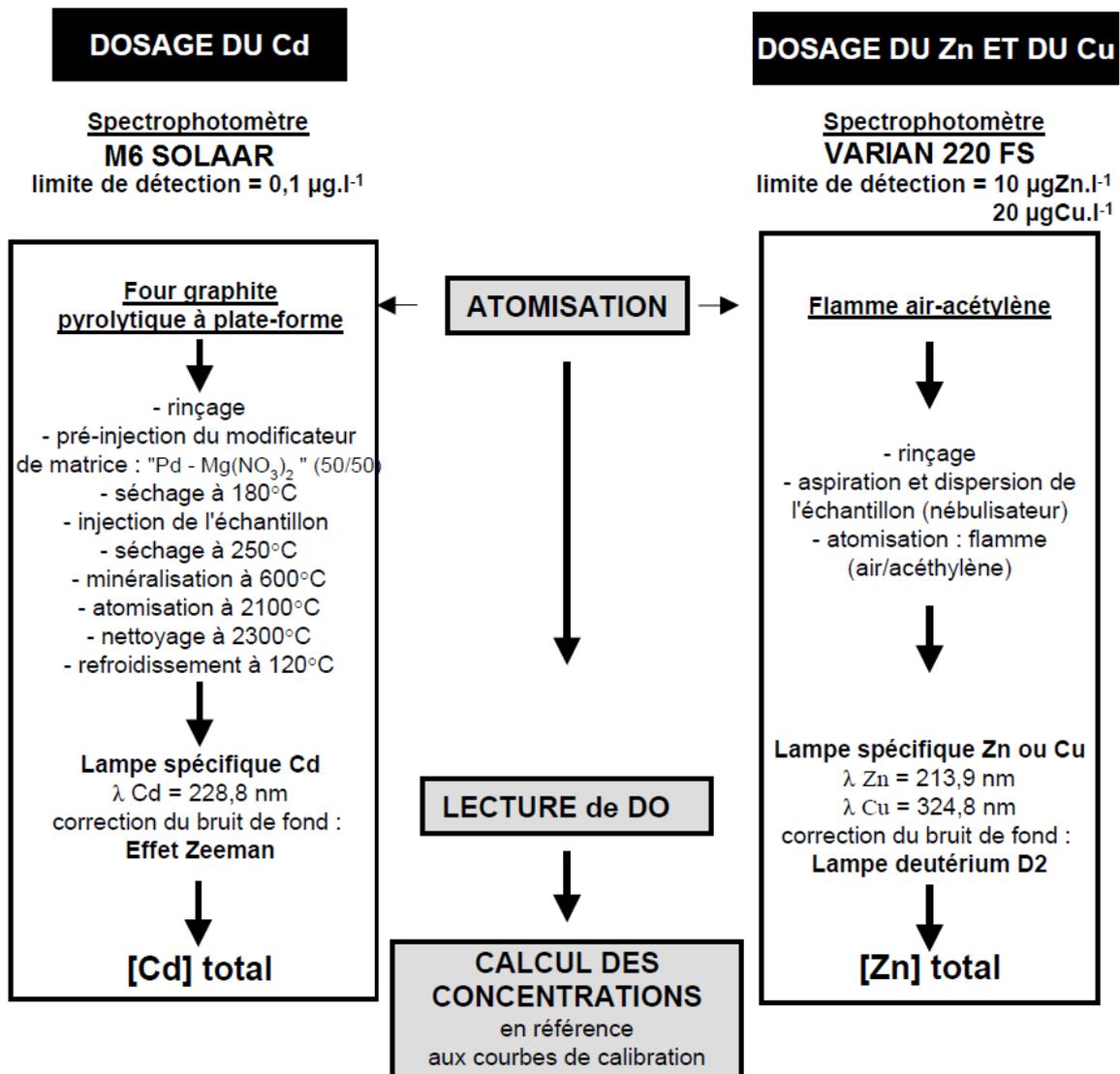


Figure 30 : Principe des dosages par absorption atomique pour le cuivre, le zinc et le cadmium (adapté de Marie, 2005)

2.4.2. Les HAPs

Les HAPs ont été extraits de différentes matrices durant cette étude selon une méthode légèrement modifiée décrite par (Crespo, 2009). Les composés quantifiés et leurs caractéristiques sont exposés en annexes (Annexe 1). Les approches *in situ* associées au projet ASCOBAR et OSQUAR ont impliqué des dosages dans les huîtres et les sédiments. Des travaux complémentaires sur le terrain durant l'été 2012 nous ont permis de nous concentrer sur cette classe de contaminant plus spécifiquement et de les doser dans les huîtres diploïdes et triploïdes, les sédiments, le microphytobenthos et l'eau. Une expérience en laboratoire a également concerné ces composés (Approche expérimentale : 3).

2.4.2.1. Traitement préalable des échantillons

Les échantillons de sédiments, huîtres et microphytobenthos ont été lyophilisés après stockage à -20°C. Après sublimation de la totalité de l'eau, les différentes matrices ont été homogénéisées. Les sédiments ont été tamisés sur 2 mm afin de supprimer les débris coquilliers ou restes d'algues. Les huîtres (entières ou organes) et le microphytobenthos ont été systématiquement broyés mécaniquement à l'aide d'un broyeur. Le stockage des lyophilisats a été réalisé à température ambiante dans des pots ambrés.

La récupération des particules a été réalisée sur des filtres tarés en fibre de verre de type GF/F (0,7 µm – Whatman). Les filtres et les unités de filtration en verre ont été préalablement calcinés à 450°C pour éviter toute contamination et autoriser l'étude de concentrations environnementales. Les filtres sont par la suite stockés à -20°C jusqu'à lyophilisation.

Les échantillons d'eau ont été conservés après filtration sur GF/F dans des flacons en verre préalablement calcinés de 10 mL à -20°C. Le traitement et l'analyse des matrices liquides est détaillé dans une section différente.

2.4.2.2. Note sur l'étalonnage interne

La méthode de quantification des HAPs dépend de l'ajout dans l'échantillon d'un composé nommé « étalon interne ». Ces molécules sont choisies pour leur ressemblance avec les analytes d'intérêt et leur absence totale de l'échantillon. Ce sont donc généralement des composés synthétiques deutérés obtenus auprès de fournisseurs de produits chimiques, que l'on ajoute dans l'échantillon en début d'extraction et qui subiront toutes les étapes du processus.

Les pertes de composés ou autres interférences matricielles seront donc équivalentes en proportion entre les molécules deutérées et « natives », ce qui rend cette technique de quantification particulièrement puissante lorsque les procédés d'extraction impliquent de nombreuses étapes comme c'est le cas ici.

L'objectif de cette méthode est de quantifier le composé recherché en fonction de son étalon interne ajouté en quantité connue. En couplage chromatographe/spectrométrie de masse, le signal affiché par l'appareil est un pic, dont la surface est proportionnelle à la quantité d'analyte. On peut donc écrire les formules :

$A_{nd} = k_{nd} * m_{nd}$	avec	A_{nd}	aire du composé non deutéré
$A_d = k_d * m_d$		A_d	aire du composé deutéré
		k_{nd}	coefficient du composé non deutéré
		k_d	coefficient du composé deutéré
		m_{nd}	masse injectée du composé non deutéré
		m_d	masse injectée du composé deutéré

Ce coefficient k_{nd} ne peut cependant être déterminé que par rapport à celui de son étalon interne. On définit alors un coefficient de réponse théorique pour le couple « analyte/étalon interne » noté K équivalent à k_{nd}/k_d . En se basant sur le rapport des formules précédentes on peut donc écrire :

$$\frac{A_{nd}}{A_d} = K * \frac{m_{nd}}{m_d}$$

$$m_{nd} = \frac{A_{nd} * m_d}{A_d * K}$$

Cette formule est au cœur du concept de l'étalonnage interne. Chaque lot d'échantillons injecté est donc accompagné de l'injection en début, milieu et fin de série d'une solution étalon préalablement préparée et de **composition connue**, comprenant à la fois les composés deutérés (mélange de solutions individuelles préparées à partir de cristaux² de pureté isotopique > 98% ; Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, MA, USA) et non deutérés (solution « PAH Mix 45³ » ; Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Allemagne).

Cette solution permet de calculer le facteur K et de vérifier au fil de la séquence que le système chromatographique est stable (stabilité de la valeur). Ce facteur est spécifique à chaque couple « analyte/étalon interne » et se rapproche théoriquement de 1 si les deux molécules présentent les mêmes caractéristiques. Son calcul permet de déterminer la masse injectée d'un composé dans un échantillon inconnu, et par extension sa concentration puisque le volume injecté est rigoureusement le même entre l'analyte et son étalon.

2.4.2.3. Extraction et purification des HAPs dans les matrices solides

L'analyse de composés organiques tels que les HAPs nécessite une étape d'extraction préalable et de purification des extraits. La méthode employée ici concerne toutes les matrices solides et a été adaptée de Baumard et al. (1997). Un schéma simplifié en présente les principales étapes (Figure 31).

La masse de matrice initialement pesée varie avec la nature de l'échantillon et sa contamination supposée : sédiments sableux (10 – 15 g) ; sédiments sablo-vaseux (5 – 10 g) ; sédiments vaseux (< 5 g) ; huître lyophilisée (< 300 mg) ; microphytobenthos (0,5 – 1 g). Une fois pesé dans un flacon en verre, l'échantillon est enrichi en étalons internes (~1 µg/g). La masse de solution d'étalons internes est notée (gravimétrie) afin de connaître la quantité précise d'étalon internes ajoutés puis l'ensemble

² Composés : naphthalène-d8, dibenzothiophène-d8, phénanthrène-d10, anthracène-d10, fluoranthène-d10, chrysène-d12, benzo(e)pyrène-d12, benzo(a)pyrène-d12, benzo(g,h,i)pérylène-d12, coronène-d12, pyrène-d10, benzo(b)fluoranthène-d12.

³ Composés : acénaphthène, acénaphthylène, anthracène, benzo(a)anthracène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(g,h,i)pérylène, benzo(a)pyrène, benzo(e)pyrène, chrysène, dibenzo(a,h)anthracène, fluoranthène, fluorène, indéno(1,2,3-c,d)pyrène, naphthalène, pérylène, phénanthrène, pyrène, dibenzothiophène, 2,1-benzonaphtho-thiophène.

est couvert par 15 mL de dichlorométhane (DCM) un solvant organique employé pour l'extraction des composés hydrophobes. Les échantillons sont ensuite soumis à l'extraction des composés par un traitement micro-ondes automatisé (80°C pendant 5 minutes ; StartE, Milestone, Shelton, Connecticut).

Les extraits ont ensuite été filtrés sur du coton en fibre de verre préalablement nettoyé (3 * extraction DCM – Ultrasons de 15 minutes), puis évaporés jusqu'à un volume d'environ 3 mL dans un évaporateur sous vide (51°C, 900 mbars, 20 minutes, vortex 70% ; RapidVap, Labconco, Kansas City, Missouri).

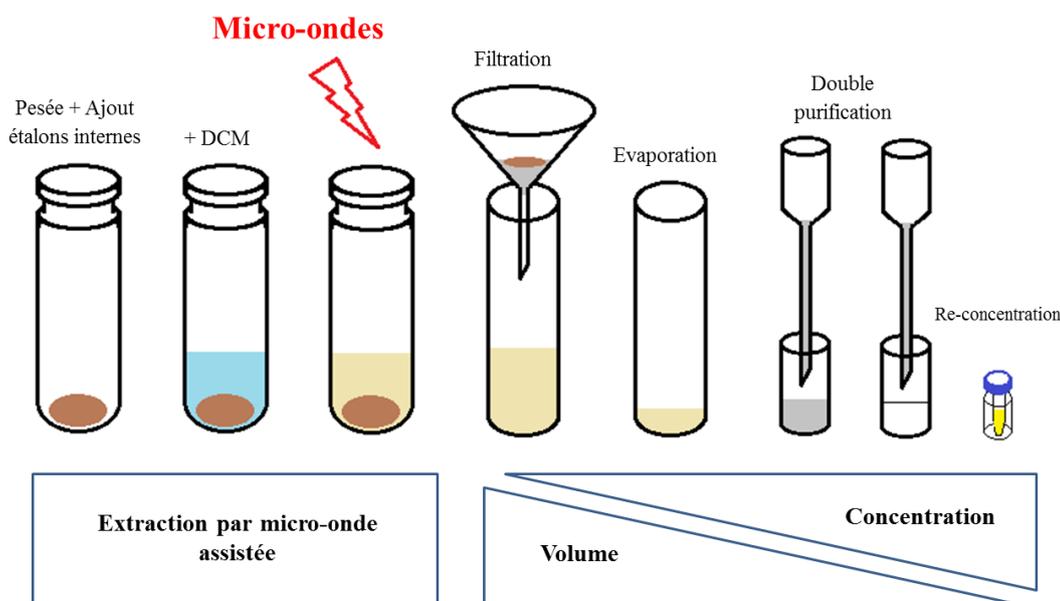


Figure 31 : Schéma simplifié des étapes d'extraction des HAPs des matrices solides

Une première purification des extraits est alors réalisée par percolation des échantillons au travers de micro-colonnes d'alumine préalablement conditionnées avec 5 mL de DCM. La phase stationnaire permet de retenir les interférents majeurs tels que les pigments et diverses macro-molécules organiques. L'élution de l'échantillon est réalisée sous vide avec 3*5 mL de DCM.

Cet éluât est alors évaporé sur plaque chauffante (45°C) et sous flux d'argon. 1 mL d'isooctane est ajouté comme contre-solvant avant l'évaporation totale du DCM. Cet extrait est ensuite purifié une seconde fois par percolation au travers de micro-colonnes de silice préalablement conditionnées avec 5 mL de pentane. 2 mL de pentane sont utilisés pour éluer les hydrocarbures insaturés, puis la fraction aromatique d'intérêt est récupérée par élution avec 3*5 mL d'un mélange DCM/Pentane (35:65, v:v).

Une dernière étape d'évaporation sous flux d'argon permet de concentrer l'échantillon aux alentours de 150 µL et de le transférer dans des restricteurs en verres. Des étalons internes dits « seringues » ou de recouvrement (pyrène-d10 et benzo(b)fluoranthène-d12) sont ajoutés en dernier lieu par gravimétrie dans des proportions équivalentes à celles des étalons internes de base pour pratiquer un étalonnage interne secondaire. Il permet de s'assurer que les différentes étapes de l'extraction n'ont pas entraîné de pertes trop importantes de composés par le calcul d'un rendement d'extraction des étalons internes ajoutés initialement en quantité connue. Si ce rendement est supérieur à 50% l'extraction est validée.

L'extrait purifié et concentré, peut être stocké à -20°C jusqu'à son analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS). Cette étape est entièrement réalisée avec du matériel dédié aux matrices environnementales faiblement contaminées. Ces précautions associées à la forte re-concentration de l'échantillon et à l'efficacité des étapes de purification permet d'atteindre des seuils de détection de l'ordre du ng/g de matière sèche.

2.4.2.4. Analyse par GC/MS

L'analyse des échantillons a été réalisée par couplage d'une technique de séparation chromatographique en phase gazeuse et d'une technique de détection par spectrométrie de masse (GC 6890 couplé à un MS 5973 inert MSD, Agilent Technologies, Waghauseel, Germany).

Un volume d'1 μL d'échantillon est injecté dans un injecteur à 280°C en mode "pulsed-splitless" (sans fuite) grâce à un gaz vecteur : l'hélium (pureté 6.0 à un débit de 1,3 mL/min). La séparation des analytes d'intérêt a alors lieu en fonction de leurs propriétés physico-chimiques qui vont induire des temps de rétention différentiels. Le temps de rétention des composés est conditionné par leurs interactions avec la phase stationnaire de la colonne capillaire et par la température du four.

La colonne est de type apolaire (méthylpolysiloxane greffée avec 5% de groupements phényles; modèle : HP-5MS-Ultra Inert 19091S-433 ; longueur : 30 m ; diamètre interne : 250 μm ; épaisseur de la phase : 0.25 μm ; Agilent Technologies, Massy, France). Le profil thermique du four est de 2 min à 50°C , 1 min à 250°C après élévation de 10°C par minute, 1 min à 280°C après élévation de 2°C par minute et 10 minutes à 310°C après élévation de 10°C par minute.

Après séparation au sein de la colonne les composés sont fragmentés sous vide par impact électronique (70 eV) au niveau d'une source d'ionisation à 230°C . Le principe de détection repose sur le fait que chaque molécule d'intérêt se fragmente d'une manière spécifique, produisant systématiquement les mêmes types d'ions fils. Ces ions chargés sont séparés par un quadripôle (150°C) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) avant d'être détectés. Pour une meilleure sensibilité, le spectromètre de masse est paramétré en mode « Single Ion Monitoring » ou SIM afin de rechercher spécifiquement les m/z des fragments des analytes recherchés. Il supprime donc une grande partie du bruit de fond en éliminant les ions non recherchés et passe plus de temps à détecter chaque ions d'intérêt (dwell time : 40 ms).

2.4.2.5. Caractérisation des matrices solides

❖ Les taux lipidiques des huîtres

Les matrices solides lyophilisées biologiques ont été caractérisées par leur taux lipidique qui présente un intérêt dans l'étude des contaminants hydrophobes. Le protocole d'extraction est similaire à celui de l'extraction des HAPs. La prise d'essai s'élève à 1 g, non dopée en étalons internes, recouvert de 15 mL de DCM. L'extraction et la filtration de l'échantillon sont réalisées comme décrit précédemment, à la différence que le filtrat est récupéré dans un flacon de 60 mL en verre préalablement pesé. Une étape d'évaporation complète est alors ajoutée en suivant le même protocole « RapidVap » décrit plus haut. Lorsque le solvant est entièrement évaporé, le flacon est à nouveau pesé. Cette opération doit être

réalisée jusqu'à ce que la masse soit stable (après refroidissement du flacon), indiquant la disparition complète du DCM. La masse du résidu déduite en soustrayant la masse du flacon vide peut être considérée comme la part lipidique extraite de l'échantillon. On peut ramener cette valeur à la masse d'échantillon pesée initialement et calculer le pourcentage de lipides dans l'échantillon.

❖ La teneur en carbone organique des sédiments

Cette variable a été évaluée sur 10 mg de sédiments préalablement lyophilisés, tamisés sur 2 mm et décarbonatés (traitement acide : HCl dilué au 10^{ème} durant 30 minutes. Etapes répétées 3 fois puis séchage à l'étuve à 40°C). Après cette préparation, les échantillons ont été pliés dans des feuilles d'étain et analysés dans un FlashEA[®] 1112 Nitrogen and Carbon Analyzer (Thermo Scientific, Waltham, Massachussets). La préparation et l'analyse des échantillons a été réalisée à l'UMR 5805 EPOC (Station Marine d'Arcachon ; Sabrina Bichon).

2.4.2.6. Contrôle qualité

❖ Estimation des limites de quantification

Le seuil de quantification d'un composé se définit tel que le rapport entre son signal et le bruit de fond du chromatogramme (« signal sur bruit » ou S/N) soit de 10. Sachant cela, il nous est possible de calculer des limites de quantification (LQ) extrapolées à partir d'échantillons enrichis et naturels afin de s'assurer des performances de la méthode et de l'extraction. Cette démarche a été employée sur deux échantillons représentatifs de l'étude *in situ* et une eau dopée (Tableau 7).

Tableau 7 : Estimation des LQ des HAPs dans les huîtres, les sédiments et l'eau salée

Composés	LQ Huîtres (ng/g)	LQ Sédiments (ng/g)	Eau (ng/L)	
Naphtalène	0,1	0,1	1,2	
Acénaphthylène	0,5		0,7	
Acénaphène			0,8	
Fluorène			0,3	
Phénanthrène			0,3	
Anthracène			0,4	
Dibenzotiofène			0,1	
Fluoranthène			0,2	
Pyrène			0,2	
Benzo(a)anthracène			0,3	
Triphénylène + Chrysène	0,3			
2-1-dibenzonaphthotiofène	0,1			
Benzo(b,k,f)fluoranthène	0,2		0,2	
Banzo(a)fluoranthène	0,1		0,1	
Benzo(e)pyrène			0,1	
Benzo(a)pyrène			0,2	
Pérylène	16,2		0,2	0,3
Indéno(1,2,3-cd)pyrène			0,1	0,1
Benzo(g,h,i)pérylène			0,1	0,1
Dibenzo(ah,ac)anthracène		0,2	0,2	
Dibenzo(a,l)pyrène		0,9	/	
Coronène				

Pour les matrices solides, il apparaît que les huîtres présentent des LQ supérieures aux sédiments pour tous les composés étudiés. En effet, la complexité des matrices biologiques rend la quantification de composés chimiques complexe car leur extraction est souvent associée à l'extraction d'interférents.

Ces LQ supérieures (de 0,1 ng/g à 2,1 ng/g) sont la conséquence d'un compromis réalisé sur la prise d'essai : suffisamment élevée pour quantifier les HAPs mais suffisamment faible pour éviter la présence de trop d'interférents (~ 0,3 g). Il faut donc logiquement une concentration en HAPs légèrement supérieure dans les huîtres pour que les composés soient quantifiables avec une prise d'essai aussi faible. Les sédiments étudiés à l'inverse ont posé moins de problèmes en termes d'interférences chromatographiques, ce qui a permis d'utiliser plus de matrice (~ 10 g) et de diminuer les seuils de quantification (< 1 ng/g).

Peu de composés ont été détectés dans les eaux filtrées et analysées en été 2012 (naphtalène, fluorène, phénanthrène, dibenzothiophène, fluoranthène, pyrène). La technique de quantification par Solid Micro Phase Extraction (SPME) a cependant montré une grande sensibilité et des LQ inférieures à 1 ng/L pour les composés identifiés.

Ces estimations attestent de la performance de la méthode d'extraction (purifications efficaces) et de la sensibilité de l'analyse chromatographique.

❖ Validation de la méthode et de l'opérateur

Un sédiment de référence interne utilisé comme carte de contrôle au laboratoire a été employé pour valider l'opérateur après comparaison aux résultats obtenus par un opérateur expérimenté. Cette matrice a été prélevée dans le port de Fontainevieille (Andernos, Bassin d'Arcachon) en 2006, lyophilisée, broyée puis tamisée sur 125 µm (granulométrie : 74% < 63 µm) afin d'optimiser son homogénéité et donc la robustesse de la carte de contrôle. On observe ainsi dans le

Tableau 8 que les résultats obtenus lors de la validation sont très proches de ceux obtenus par l'opérateur expérimenté et concordent globalement avec la carte de contrôle : 16 composés sur 20 présentent des rendements supérieurs à 70%. Les faibles pourcentages observés pour le naphthalène (65%), l'acénaphthène (53%) et le dibenzothiophène (64%) sont liés à leur faible poids moléculaire (pertes lors des processus d'évaporation) et à leur faible concentration dans la matrice.

Cette carte de contrôle a été par la suite employée à plusieurs reprises durant les diverses extractions réalisées afin de s'assurer de la robustesse de la méthode

(Tableau 8). Les moyennes réalisées à partir de 15 extractions indiquent une bonne cohérence avec la carte de contrôle en dépit d'une variabilité plus importante pour les composés de faible poids moléculaire (N, Acty, Acte, Fe, DBT, Phe, An).

Ces derniers ne sont cependant pas les plus abondants dans la matrice de référence. Ainsi la somme moyenne des concentrations des 20 HAPs quantifiés s'élève à 2066 ng/g avec un écart-type de 402 ng/g, ce qui correspond à une variabilité de 19%.

Tableau 8 : Validation de l'opérateur et robustesse de la méthode – comparaison avec un opérateur expérimenté et utilisation d'une carte de contrôle interne

Composés	Carte de contrôle interne moyenne 2006 – 2011 ± 20% (ng/g, ps)	Opérateur expérimenté (ng/g, ps)	Validation (ng/g, ps)	Moyennes sur 15 extractions (ng/g, ps)	Ecart-type sur 15 extractions (ng/g, ps)
Naphtalène	15,3 ± 3,1	8,39 (55)	10,0 (65)	9,6 (63)	5,7
Acénaphthylène	12,9 ± 2,6	10,6 (83)	9,9 (77)	11,7 (91)	4,0
Acénaphthène	5,8 ± 1,2	5,0 (86)	3,1 (53)	3,1 (53)	2,0
Fluorène	7,3 ± 1,5	7,2 (99)	6,5 (89)	6,4 (88)	2,1
Dibenzothiophène	7,1 ± 1,4	5,8 (82)	4,5 (64)	5,6 (79)	2,4
Phénanthrène	90,2 ± 18,0	84,1 (93)	80,8 (90)	90,3 (100)	21,6
Anthracène	19,7 ± 3,9	13,4 (68)	13,8 (70)	17,1 (87)	6,7
Fluoranthène	326,1 ± 65,2	269,0 (83)	266,0 (82)	302,9 (93)	41,9
Pyrène	262,8 ± 52,6	211,5 (80)	203,8 (78)	243,9 (93)	58,9
2,1 Benzonaphtothiophène	26,2 ± 5,2	29,5 (112)	26,5 (101)	27,9 (107)	4,8
Benzo(a)anthracène	145,1 ± 29,0	112,3 (77)	107,8 (74)	128,1 (88)	35,3
Triphénylène + Chrysène	176,8 ± 35,4	166,4 (94)	150,0 (85)	166,7 (94)	22,8
Benzo(b,j,k)fluoranthène	373,4 ± 74,7	340,0 (91)	325,3 (87)	339,6 (91)	43,4
Benzo(a)fluoranthène	47,2 ± 9,4	33,7 (71)	36,6 (77)	33,3 (70)	5,2
Benzo(e)pyrène	136,3 ± 27,3	122,6 (90)	121,4 (89)	122,0 (90)	15,4
Benzo(a)pyrène	160,3 ± 32,1	141,4 (88)	161,0 (100)	139,8 (87)	41,9
Pérylène	71,7 ± 14,3	58,9 (82)	58,4 (82)	53,9 (75)	10,9
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	213,8 ± 42,8	134,6 (63)	125,7 (59)	188,6 (88)	46,9
Dibenzo(ah,ac)anthracène	31,7 ± 6,3	18,9 (60)	30,3 (96)	37,3 (118)	8,0
Benzo(g,h,i)perylène	135,6 ± 27,1	128,3 (95)	119,4 (88)	138,5 (102)	22,1

Les chiffres entre parenthèses représentent le pourcentage par rapport à la moyenne 2006 – 2011 de la carte de contrôle interne.

❖ Suivi des blancs de manipulation

La Figure 32 représente les moyennes des teneurs par composés obtenues dans les blancs de manipulation lors des différentes extractions réalisées. On observe que les composés de faible poids moléculaires peuvent être quantifiés à des teneurs supérieures à 2 ng (naphtalène, phénanthrène). Cette quantité de composé peut être du même ordre de grandeur que les quantités extraites des matrices biologiques pour lesquelles la prise d'essai est faible (0,3 g).

Leur présence dans les blancs est liée à leur rémanence dans l'environnement et à leur forte volatilité. A l'inverse les composés plus lourds sont rarement observables et ne dépassent jamais 1 ng dans les blancs.

Seul le coronène s'observe parfois à l'état de trace, probablement en lien avec la pureté isotopique de son étalon deutéré plus faible (97%) que pour les autres composés deutérés (98 – 99,2%). Ces observations indiquent donc des blancs très faiblement pollués, ce qui est compatible avec l'étude de niveaux environnementaux de contamination.

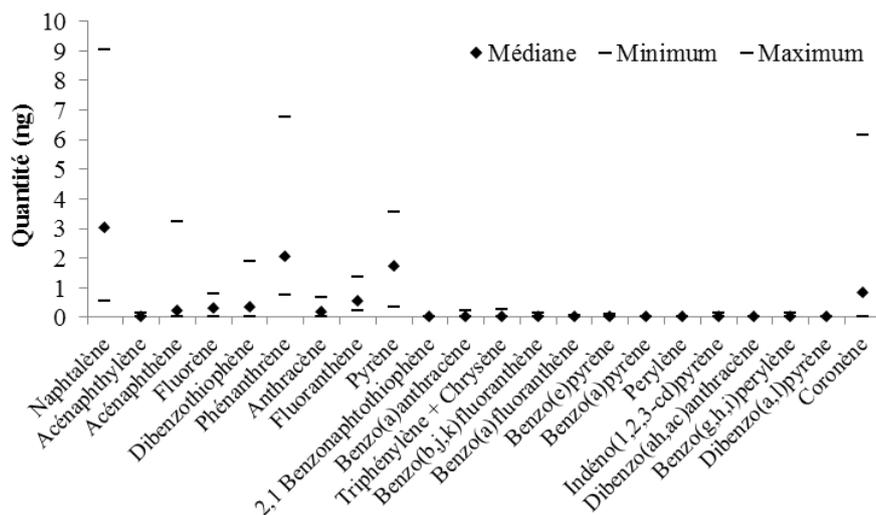


Figure 32 : Teneurs en HAPs mesurées dans les blancs de manipulation

Le Tableau 9 permet en complément des blancs, d'observer les teneurs en HAPs mesurées dans les différentes matrices solides testées (sédiments et huîtres). Il apparaît qu'un facteur 10 est respecté pour la majorité des composés (rapport : médiane matrice solide / médiane blanc) entre les teneurs mesurées dans les matrices environnementales et les teneurs observées dans les blancs. Le bruit de fond mesuré dans les blancs pour les composés les plus légers peut cependant être du même ordre de grandeur que la quantité extraite, particulièrement dans le cas des matrices biologiques.

Tableau 9 : Vue d'ensemble des quantités de HAPs extraites lors de l'analyse des sédiments et des huîtres issus des échantillons du programme OSQUAR (n = 45 huîtres et n = 47 sédiments)

Quantités dosées Sédiments/Huîtres (ng)	Médiane	Minimum	Maximum
Naphtalène	4,3 / 1,4	1,1 / 0,8	123,8 / 3,3
Acénaphthylène	2,6 / 0,3	0,1 / 0,1	417,9 / 1,3
Acénaphthène	1,2 / 0,7	0,1 / 0,2	134,7 / 1,3
Fluorène	2,7 / 0,6	0,3 / 0,2	997,8 / 1,1
Dibenzothiophène	1,8 / 0,3	0,2 / 0,2	643,2 / 1,5
Phénanthrène	30,1 / 4,1	2,6 / 2,9	4608,6 / 11,1
Anthracène	7,5 / 0,4	0,2 / 0,1	2060,5 / 1,1
Fluoranthène	76,5 / 10,3	1,9 / 3,9	4359,2 / 24,0
Pyrène	66,0 / 12,2	3,1 / 0,7	5264,0 / 30,1
2,1 Benzonaphtothiophène	5,2 / 0,6	0,2 / < ld	455,2 / 2,1
Benzo(a)anthracène	40,5 / 4,2	0,9 / 0,8	6140,4 / 13,9
Triphénylène + Chrysène	41,0 / 7,3	1,1 / 2,2	3801,9 / 14,9
Benzo(b,j,k)fluoranthène	86,2 / 16,8	3,0 / 3,4	4142,7 / 33,4
Benzo(a)fluoranthène	7,7 / 0,5	0,2 / < ld	717,7 / 4,6
Benzo(e)pyrène	32,6 / 5,3	1,1 / 1,2	1373,6 / 10,4
Benzo(a)pyrène	47,0 / 1,0	0,8 / 0,2	2148,5 / 6,7
Pérylène	14,4 / 0,8	0,3 / 0,3	824,4 / 4,2
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	47,8 / 2,1	1,1 / 0,5	1906,1 / 8,4
Dibenzo(ah,ac)anthracène	8,6 / 0,5	< ld / < ld	584,6 / 1,6
Benzo(g,h,i)perylène	44,0 / 2,3	1,1 / 0,5	1493,4 / 5,7
Dibenzo(a,l)pyrène	32,7 / 0,3	< ld / < ld	3386,9 / 3,8
Coronène	16,7 / 1,3	< ld / < ld	1809,9 / 6,8

❖ Suivi des rendements d'extraction des étalons internes

Le pyrène-d10 et le benzo(b)fluoranthène-d12 ont été ajoutés en quantité connue à chaque échantillon avant l'analyse en GC/MS afin de réaliser un étalonnage interne secondaire.

Tableau 10 : Rendements moyens d'extraction des étalons internes deutérés lors des analyses de sédiments et d'huîtres des échantillons du programme OSQUAR

Rendements deutérés (%)	Huîtres	Sédiments
Naphtalène-d8	72 ± 17	64 ± 27
Dibenzotiofène-d8	67 ± 16	67 ± 18
Phénanthrène-d8	85 ± 8	79 ± 11
Anthracène-d10	87 ± 13	72 ± 19
Fluoranthène-d10	90 ± 8	88 ± 14
Chrysène-d12	101 ± 14	91 ± 15
Benzo(e)pyrène-d12	88 ± 8	89 ± 7
Benzo(a)pyrène-d12	96 ± 12	85 ± 15
Benzo(g,h,i)perylène-d12	77 ± 13	81 ± 11
Coronène-d12	52 ± 18	43 ± 21

Les valeurs affichées sont des pourcentages ± écart-type (n = 45 huîtres et n = 47 sédiments)

En se basant sur les prélèvements issus du terrain pour le programme OSQUAR (Tableau 10), il apparaît que la plupart des composés présentent des rendements d'extraction supérieurs à 50%. Ces résultats indiquent des pertes peu importantes de composés durant les processus d'extraction (évaporations) ce qui assure une quantification fiable des HAPs d'intérêt.

2.4.2.7. Analyse des HAPs de la phase dissoute

Les HAPs dissous ont été analysés par micro-extraction sur phase solide (Solid Phase MicroExtraction – SPME) selon une méthode identique à celle décrite par (Crespo, 2009) et (de Perre et al., 2013). Cette méthode présente l'avantage de ne pas nécessiter d'extraction préalable des composés puisqu'elle est réalisée en ligne juste avant analyse en GC/MS (Figure 33). L'eau filtrée (9 mL dans un vial en verre) est conservée à -20°C, décongelée, dopée en étalons internes, puis disposée sur l'appareil de mesure : un GC/MS équipé d'une fibre SPME.

La technique se base sur l'utilisation automatisée de cette fibre de silice qui est tapissée d'un polymère présentant une certaine affinité pour les composés d'intérêt. Chaque échantillon d'eau subit d'abord une étape d'incubation de 5 minutes à 40°C avec une agitation de 250 rpm dans le four d'un auto-échantillonneur (CombiPal ; Gerstel MPS2XL, Gerstel, Mülheim, Allemagne). Une fibre au revêtement PDMS (Polydimethylsiloxane) de 100 µm d'épaisseur de type Merlin associée à une aiguille de 23 gauges (Merlin Microseal ®, Supelco, Bellefonte, Pennsylvanie) est alors immergée dans l'échantillon, chauffé à 40°C et agité à 250 rpm pendant une heure (= extraction des composés par la fibre). Au terme de ce délai, les composés extraits par la fibre sont désorbés dans l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse (GC modèle Agilent 7890 couplé à un MS 5975 inert XL EI/CI MSD, Agilent Technologies, Waghaeusel, Germany) chauffé à 270°C pendant 5 minutes.

Après désorption, les composés sont séparés dans une colonne similaire à celle décrite précédemment (cd. « Analyse par GC/MS ») et dans des conditions identiques, hormis en ce qui concerne le profil

thermique. La température initiale est maintenue à 50°C pendant deux minutes, puis augmentée (10°C par minute) et stabilisée 5 minutes à 300°C. Les paramètres de détection sont les mêmes que ceux décrits précédemment (cf. « Analyse par GC/MS »).

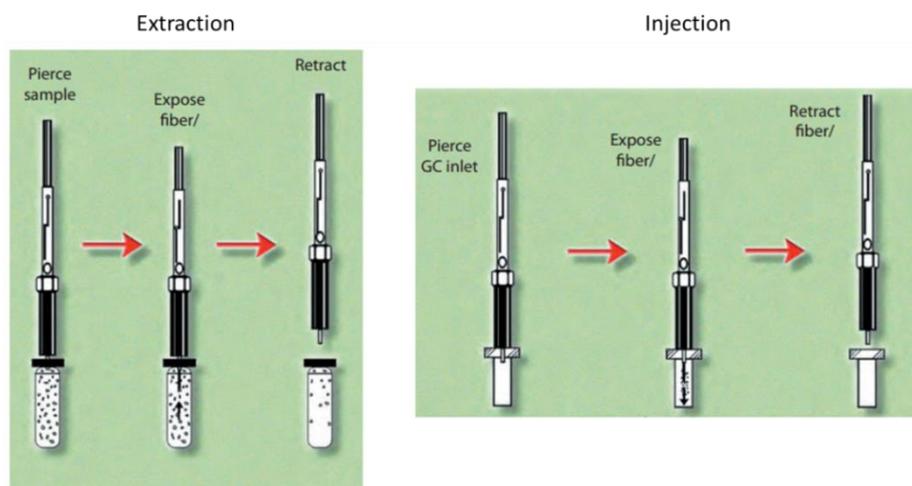


Figure 33 : Principe de la SPME

(www.sigmaaldrich.com)

La présence d'étalons internes adsorbés à la fibre en proportions équivalentes aux composés natifs permet la quantification des molécules d'intérêt. Des coefficients de réponses (« K ») propres à chaque composé sont cependant calculés au préalable après injection en début de séquence d'une solution étalon de composition connue (cf. « Note sur l'étalonnage interne »).

❖ Validation de l'analyse par SPME

Afin d'assurer une quantification optimale des composés dans la phase dissoute, une solution étalon « pseudo-inconnue » préparée avant l'analyse a été injectée dans le système. Cette solution a été préparée de la même manière que celle permettant le calcul des coefficients de réponse K. Il s'agit d'eau milliQ salée à 35 psu (matrice équivalente à celle des échantillons) dopée avec une quantité connue d'étalons internes (solution à environ 20 ng/g dans de l'éthanol) et de composés natifs (solution à environ 10 ng/g dans de l'acétonitrile) (cf. « Note sur l'étalonnage interne »). La quantification des composés natifs a été réalisée de la même manière que pour un échantillon de composition inconnue (utilisation des coefficients de réponses), puis les quantités « ajoutée » et « calculées » ont été comparées pour obtenir des rendements présentés dans le Tableau 11.

Ces résultats indiquent une quantification optimale des composés d'intérêt dans la phase dissoute. Les coefficients de réponse calculés en début de séquence ont bien permis de quantifier les HAPs d'intérêt dans une matrice proche de celle des échantillons naturels (eau salée filtrée sur 0,7 µ).

Tableau 11 : Rendements obtenus après analyse d'une solution étalon "pseudo-inconnue" en SPME

Composés	Etalons internes affiliés	Masse de composé ajoutée (pg)	Masse de composé calculée (pg)	Rendements (%)
Naphtalène	Naphtalène d8	148,5	143,1	96
Dibenzothiophène	Dibenzothiophène d8	130,5	125,3	96
Acenaphthylène	Acenaphthylène d8	148,5	154,5	104
Acenaphène	Acenaphène d10	148,5	146,9	99
Fluorène	Fluorène d10	148,5	155,1	104
Phénanthrène	Phénanthrène d10	148,5	153,6	103
Anthracène	Anthracène d10	148,5	146,9	99
Fluoranthène	Fluoranthène d10	148,5	143,1	96
Pyrène	Pyrène-d10	148,5	148,9	100
Benzo(a)anthracène	Benzo(a)anthracène-d12	148,5	148,6	100
Chrysène	Chrysène d12	148,5	149,8	101
Benzo(b)fluoranthène	Benzo(b)fluoranthène-d12	148,5	148,6	100
Benzo(a)fluoranthène	Benzo(k)fluoranthène-d12	148,5	160,5	108
Benzo(e)pyrène	Benzo(e)pyrène d12	148,5	154,4	104
Benzo(a)pyrène	Benzo(a)pyrène d12	148,5	153,4	103
Pérylène	Pérylène d12	148,5	147,1	99
Indéno(1,2,3_c,d)pyrène	Indéno(1,2,3-cd)pyrène-d12	148,5	142,2	96
Dibenzo(a)anthracène	Dibenzo(a,h)anthracène-d12	148,5	147,7	99
Benzo(g,h,i)pérylène	Benzo(g,h,i)pérylène d12	148,5	160,8	108
2,1-d Benzonaphthothiophène	Chrysène d12	135,4	129,2	95

2.4.3. Les pesticides

Ces composés ont été quantifiés dans les échantillons d'eau prélevés durant l'expérience « cuivre / pesticides » réalisée en 2012. Le suivi de la contamination a été réalisé dans les unités expérimentales concernées par la contamination en pesticides (conditions « pesticides » et « pesticides/cuivre ») selon la méthode décrite par Belles (2012).

❖ Extraction sur phase solide

Les pesticides étudiés ont été extraits sur phase solide (Solid Phase Extraction ou SPE). Après acidification à pH 2 (HCl) les échantillons d'eau sont dopés en étalons internes puis percolés au travers de cartouches SPE (Oasis[®] HLB, 3cc, 60 mg, Waters, Milford, Massachussets, USA) préalablement conditionnées par 3 mL de méthanol et 3 mL d'eau acidifiée à pH 2 (HCl).

Une fois que l'échantillon a traversé la phase adsorbante et que les composés d'intérêt y sont donc retenus, une période de séchage sous vide d'air de 30 minutes est respectée. Les pesticides sont finalement élués avec 3 mL de méthanol. Cet extrait est évaporé sous flux d'azote jusqu'à son transfert dans des flacons d'injections munis de restricteurs en verre de 300 µL.

❖ Analyse par chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS)

L'appareillage utilisé pour l'analyse des pesticides est un couplage entre un chromatographe liquide (séparation) et un spectromètre de masse en tandem (HPLC infinity 1290 Agilent Technologies couplé à un spectromètre de masse triple quadrupôle Agilent Technologies 6460).

Un volume de 5 µL d'échantillon est injecté dans le système. La séparation chromatographique a lieu dans une colonne C18 de marque Kinetex[®] (100x2,1 mm ; 1,7 µm) chauffée à 35°C avec un débit de 0,5 mL/min. L'élution est réalisée par une phase mobile dont la composition évolue au fil de l'analyse (gradient). Initialement, elle est constituée à 100% d'eau ultrapure (avec 0,1% d'acide acétique et 5 mM d'acétate d'ammonium). Cette proportion décroît régulièrement au profit d'un solvant organique (méthanol) pendant 14 minutes jusqu'à atteindre 0%. Un palier à 100% de méthanol est alors maintenu 1 minute pour rincer la colonne. Enfin, la proportion de méthanol est ramenée à 0% en 2 minutes. Après élution, les composés sont ionisés au niveau d'une source ESI+ Agilent Jet Stream.

Première partie : approche *in-situ*

1.	INTRODUCTION DE L'APPROCHE <i>IN-SITU</i>	117
2.	ASCOBAR : BILAN DE LA DEUXIEME ANNEE DE SUIVI (2009 – 2010).....	118
2.1.	<i>Introduction</i>	118
2.2.	<i>Résultats</i>	118
2.2.1.	La croissance	118
2.2.2.	La bioaccumulation métallique.....	120
2.2.2.1.	Le cuivre.....	121
2.2.2.2.	Le zinc	123
2.2.2.3.	Le cadmium	125
2.2.3.	Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)	127
2.2.3.1.	Dans les huîtres cultivées.....	128
2.2.3.2.	Dans les sédiments	128
2.2.4.	La production de métallothionéines.....	129
2.2.5.	Les expressions géniques relatives	131
2.2.5.1.	Dans les branchies	132
2.2.5.2.	Dans la glande digestive	134
2.2.6.	Physico-chimie du milieu	136
2.2.7.	Analyse en composantes principales (ACP)	137
2.2.7.1.	Dans les branchies	137
2.2.7.2.	Dans la glande digestive	139
2.3.	<i>Discussion</i>	141
2.3.1.	Croissance et reproduction des huîtres transplantées	141
2.3.2.	La contamination des organismes transplantés	142
2.3.2.1.	Par les métaux	142
2.3.2.2.	Par les HAPs.....	144
2.3.3.	Le suivi des biomarqueurs	145
2.3.3.1.	Les concentrations en métallothionéines	145
2.3.3.2.	Les expressions géniques relatives	146
2.3.4.	Les paramètres physico-chimiques du milieu	148
2.3.5.	Analyse statistique globale des données	149
2.4.	<i>Conclusion</i>	150
3.	OSQUAR : BILAN DE DEUX ANNEES DE SUIVI (2010 – 2012).....	151
3.1.	<i>Introduction</i>	151
3.2.	<i>Résultats</i>	151
3.2.1.	La croissance	151
3.2.2.	La bioaccumulation métallique.....	153
3.2.2.1.	Le cuivre.....	153
3.2.2.2.	Le zinc	154
3.2.2.3.	Le cadmium	155
3.2.3.	Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs).....	157
3.2.3.1.	Dans les huîtres cultivées.....	157
3.2.3.2.	Dans les sédiments	158
3.2.3.3.	Empreinte moléculaire des échantillons analysés	159
3.2.4.	La production de métallothionéines.....	160

3.2.5.	Les expressions géniques relatives	162
3.2.5.1.	Année 1.....	162
3.2.5.2.	Année 2.....	165
3.2.6.	Physico-chimie du milieu.....	168
3.2.7.	Analyse en composantes principales (ACP)	169
3.2.7.1.	Pour les branchies.....	169
3.2.7.2.	Pour la glande digestive.....	171
3.3.	<i>Discussion</i>	173
3.3.1.	Croissance et reproduction des huîtres transplantées	173
3.3.2.	La contamination des organismes transplantés	175
3.3.2.1.	Par les métaux	175
3.3.2.2.	Par les HAPs.....	177
3.3.3.	Le suivi des biomarqueurs	178
3.3.3.1.	Les métallothionéines.....	178
3.3.3.2.	Les expressions géniques relatives	179
3.3.4.	Les paramètres physico-chimiques du milieu.....	181
3.3.5.	Analyse statistique globale des données	182
3.4.	<i>Conclusion</i>	183
4.	FOCUS : ETUDE DES REPONSES LIEES A LA REPRODUCTION ET A UNE EXPOSITION AUX HAPS DURANT L'ETE 2012.....	185
4.1.	<i>Introduction</i>	185
4.2.	<i>Résultats</i>	186
4.2.1.	La croissance et reproduction	186
4.2.2.	Les Hydrocarbure Aromatiques Polycycliques (HAPs)	188
4.2.2.1.	Dans les huîtres	188
4.2.2.2.	Dans les sédiments	189
4.2.2.3.	Dans l'eau	190
4.2.2.4.	Dans le microphytobenthos.....	190
4.2.3.	La production de métallothionéines.....	191
4.2.4.	Les expressions géniques relatives	192
4.2.5.	Les dommages à l'ADN	196
4.3.	<i>Discussion</i>	196
4.3.1.	La croissance et la reproduction des huîtres transplantées.....	196
4.3.2.	La contamination en HAPs.....	197
4.3.3.	Le suivi des biomarqueurs	198
4.3.3.1.	Les métallothionéines.....	198
4.3.3.2.	Les expressions géniques relatives et les dommages à l'ADN.....	199
4.4.	<i>Conclusion</i>	200
5.	BILAN DU SUIVI <i>IN SITU</i>	201

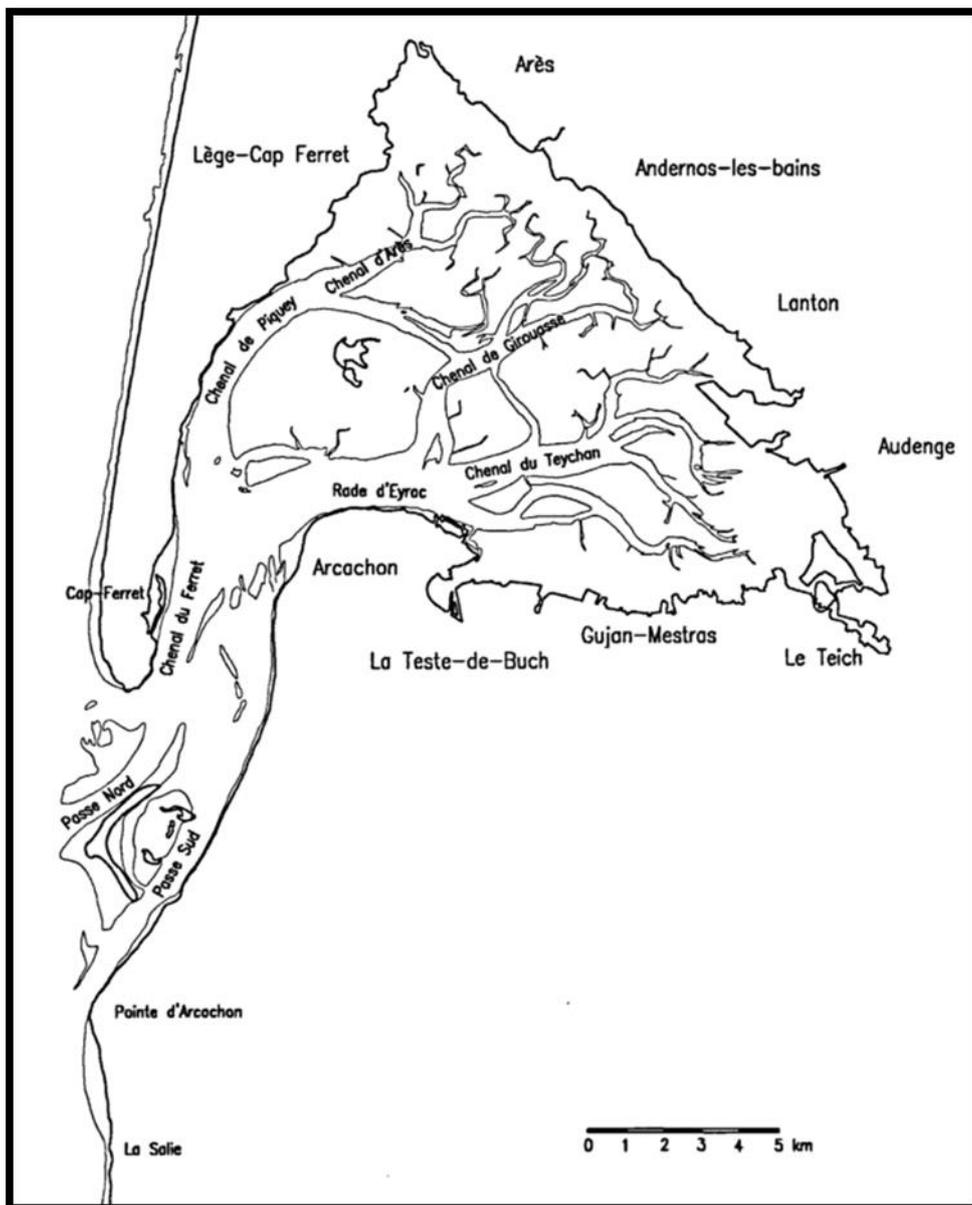


Figure 34 : Carte des chenaux principaux du Bassin d'Arcachon (Ifremer - 1997)

1. Introduction de l'approche *in-situ*

Le Bassin d'Arcachon est un hydrosystème côtier du Sud-Ouest français réputé tant sur le plan écologique que sur le plan économique. Cette lagune semi-fermée située par 44°40 N et 1°10 W se caractérise par une superficie de 180 km² (Bouchet et al., 1997b) et par son système de passes le reliant au golfe de Gascogne (Figure 34). Les caractéristiques climatiques et hydrodynamiques de cet écosystème lui confèrent de plus des conditions de vie favorables à la pratique de l'ostréiculture.

Cette activité représente un des piliers économiques de la région. Pendant longtemps le Bassin d'Arcachon a par ailleurs été un site de captage naturel exceptionnel, et fournissait 70% du naissain français. Cependant cette activité est mise en péril par l'occurrence de mortalités estivales plus ou moins importantes. Ce phénomène est observé dans le Bassin d'Arcachon sur des individus jeunes et adultes depuis l'introduction de *Crassostrea gigas* dans les années 70, et a donné lieu à de nombreuses études des années 80 à aujourd'hui (Maurer et Comps, 1986).

Cependant, des évènements plus récents de mortalité du naissain pouvant atteindre 80% ont été observés depuis 2008 sur tout le littoral français (de la Manche à la Méditerranée). L'atteinte des juvéniles rend difficile le renouvellement des stocks des ostréiculteurs.

De nombreuses hypothèses ont été avancées depuis l'observation du phénomène pour expliquer ces mortalités exceptionnelles. Les conclusions émises évoquent principalement une potentielle interaction entre des facteurs biotiques tels que la gamétogenèse, et abiotiques tels que la température. Cependant, peu d'études se sont attardées sur le rôle éventuel des contaminants chimiques dans l'occurrence de ces épisodes.

Les projets Régionaux ASCOBAR et OSQUAR ont donc été mis en place dans ce contexte de crise ostréicole. Un des axes de recherches de ces programmes concerne particulièrement le modèle biologique *Crassostrea gigas*, et s'intéresse notamment au rôle de la contamination chimique du Bassin d'Arcachon dans l'avènement de ces mortalités.

L'approche *in situ* présentée ici, est issue de cette démarche et constitue la base des travaux réalisés durant ces 3 années. Le suivi mis en place et les opérations de «caging» ont ainsi permis de faire l'état des lieux de la contamination de la baie, dans un contexte « multi-résidus » et « multi-compartiments ». Les questions sous-tendues par cette étude sont :

Quel est l'état de contamination chimique de la lagune ? Quels sont les compartiments et les polluants concernés ? Quelles sont leurs origines potentielles ?

L'huître creuse est-elle exposée à cette contamination ? Comment y répond-elle ?

2. ASCOBAR : bilan de la deuxième année de suivi (2009 – 2010)

2.1. Introduction

Le projet région Aquitaine **ASCOBAR** (Apports Scientifiques face à la problématique CONchylicole du Bassin d'ARcachon) s'est déroulé de 2008 à 2010. Comme détaillé précédemment, deux opérations de transplantation ou « *caging* » ont été réalisées pour ce programme en parallèle du suivi de la contamination des sédiments. Les travaux présentés ici ayant débuté avec la seconde année de suivi, un intérêt particulier sera accordé à cette période.

Les détails de la mise en place du suivi terrain et de la stratégie d'échantillonnage ayant été donnés précédemment, ils ne seront pas rappelés ici. Les pages qui suivent s'attarderont donc sur la description et l'interprétation des résultats obtenus en 2009 – 2010 concernant : (1) la croissance des huîtres transplantées (longueur de coquille, masse du corps mou et indices de condition), (2) la bioaccumulation des métaux (cuivre, zinc et cadmium), (3) la bioaccumulation en HAPs (16 composés prioritaires de l'US EPA), (4) la synthèse de MTs, (5) les expressions géniques relatives (9 gènes de stress) et (6) l'accumulation des HAPs dans les sédiments.

NB : Les poches d'huîtres du site Eyrac ayant été vandalisées en mars 2010, ce point présente une valeur de moins en fin de cinétique pour tous les paramètres mesurés.

2.2. Résultats

2.2.1. La croissance

*Les valeurs présentées pour les paramètres de croissance sont les moyennes sur 5 individus \pm l'écart-type (seule la moitié basse apparaît pour des raisons de lisibilité). Les lettres en majuscule mettent en évidence l'effet « site » global (ANOVA 2 facteurs « Site*Temps », $p < 0.05$). Des ANOVA à 1 facteur complémentaires au niveau de chaque site ont été réalisées pour faire apparaître l'effet temps : lettres minuscules (ANOVA 1 facteur « Temps », $p < 0,05$). Le test a posteriori utilisé est le « Tuckey HSD » (XLSTAT 2013).*

Les résultats de **croissance du corps mou** sont présentés dans la Figure 35. De manière globale tout d'abord il apparaît que les huîtres de Grand Banc et Arguin présentent à la fois les masses les plus importantes, mais également les croissances mesurées les plus fortes puisque les masses fraîches des organismes sont respectivement multipliées par 4,6 entre mai 2009 et mars 2010 pour Arguin (de $2 \pm 0,5$ g à $9,2 \pm 2,1$ g), et par 2,9 pour Grand Banc (de $3,1 \pm 0,7$ g à $9,1 \pm 1,5$ g). Les stations de Bélisaire et Ile aux oiseaux présentent des masses intermédiaires durant l'année, qui n'évoluent pas de manière significative dans le temps (environ 3 g) excepté en mars 2010. Une croissance importante est en effet constatée en fin de cinétique pour ces deux stations avec des maximums atteints en mars 2010 représentant 2,3 fois les valeurs observées en mai 2009 pour Bélisaire (de $3 \pm 0,5$ g à $6,9 \pm 1,1$ g) et 2,2 fois pour Ile aux oiseaux (de $2,9 \pm 0,8$ g à $6,2 \pm 0,4$ g). Les huîtres des sites Le Tès et Eyrac en revanche ne présentent aucune évolution significative des masses de corps mou tout au long du suivi.

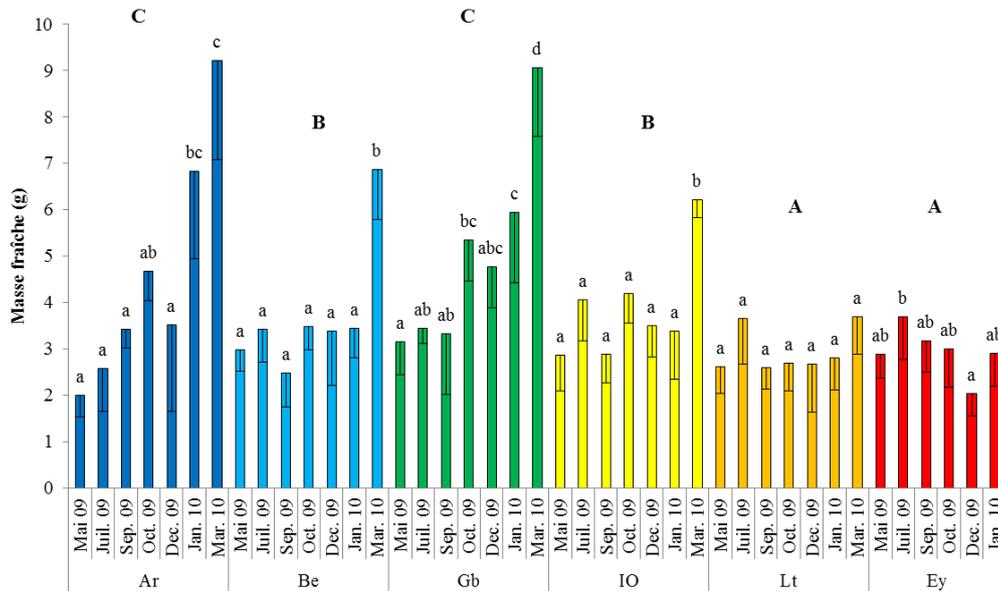


Figure 35 : Masses de corps mou des huîtres cultivées prélevées durant la deuxième année du programme ASCOBAR

Le même type d'observation peut être fait concernant les **longueurs de coquilles** sur la Figure 36. Le site Arguin présente encore à la fois les tailles les plus importantes de manière globale, et la croissance la plus forte dans le temps avec un facteur 1,5 entre mai 2009 et janvier 2010 (de $6,7 \pm 0,2$ cm à $10,1 \pm 0,8$ cm).

La station Grand Banc se place de façon intermédiaire avec un facteur 1,3 entre mai 2009 et janvier 2010 (de $6,5 \pm 0,6$ cm à $8,6 \pm 0,7$ cm). Les stations Bélisaire, Ile aux oiseaux et Eyrac présentent des tailles de coquilles équivalentes à Grand Banc et des croissances significatives (Be : de $6,9 \pm 0,6$ cm à $8,6 \pm 0,5$ cm ; Io : de $6,5 \pm 0,4$ cm à $8,9 \pm 1,4$ cm ; Ey : de $6,4 \pm 0,7$ cm à $8 \pm 0,3$ cm). Les huîtres issues de Le Tès enfin, montrent à la fois les valeurs les plus faibles des 6 stations, mais également une absence de croissance significative durant l'année de suivi.

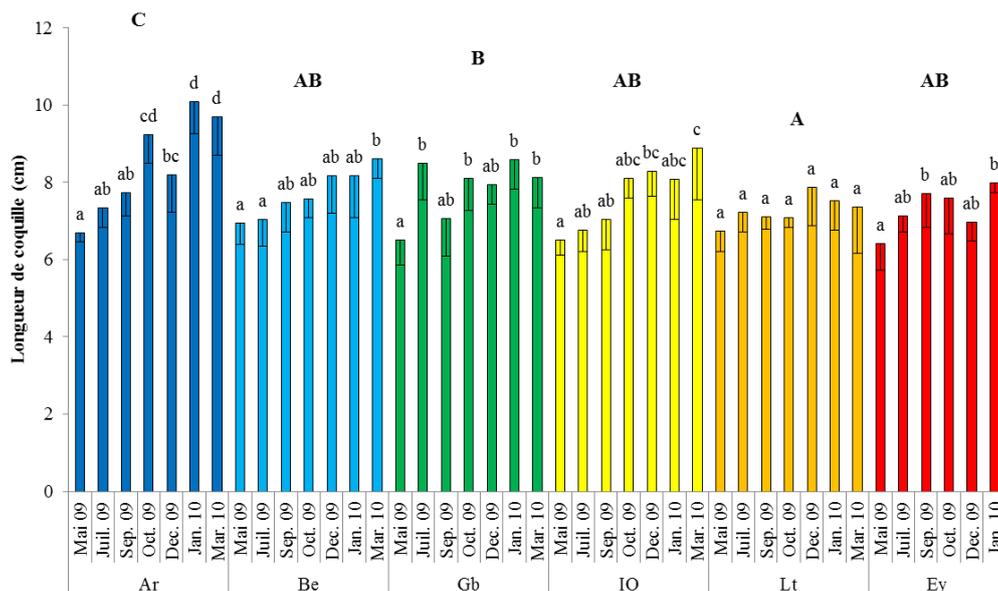


Figure 36 : Longueurs des coquilles des huîtres cultivées prélevées durant la deuxième année du programme ASCOBAR

Enfin les **indices de condition** (IC), représentant une indication du « remplissage » de la coquille par le corps mou de l'organisme, présentent des tendances légèrement différentes (Figure 37). De manière globale, le site de Grand Banc présente les IC les plus élevés. Les stations Arguin et Ile aux oiseaux se situent de façon intermédiaire, puis les sites de Bélisaire, Eyrac et Le Tès présentent les valeurs globalement les plus faibles.

En ce qui concerne l'évolution dans le temps de ces indices, certaines tendances se retrouvent d'un site à l'autre. De façon générale, les valeurs significativement les plus élevées apparaissent en mars 2010 (Ar : $25,4 \pm 6,3$; Be : $24,3 \pm 3,5$; Gb : $25,6 \pm 3,2$; Io : $20,5 \pm 2,5$; Lt : $15,7 \pm 2,8$) et en mai/juillet 2009 (Be : $18,4 \pm 4,7$; Gb : $21,7 \pm 4,3$; Io : $21,2 \pm 3,5$; Lt : $18,7 \pm 4,4$; Ey : $20,6 \pm 7,1$). Les pics estivaux précèdent d'importantes chutes dans les valeurs qui mènent à des minimums observés entre septembre et décembre 2009 pour Bélisaire ($10,1 \pm 1,9$), Grand Banc ($14,4 \pm 3,2$), Ile aux oiseaux ($13,4 \pm 2,9$), Le Tès ($10,5 \pm 3$) et Eyrac ($11,5 \pm 4,6$). La station Arguin en revanche, ne présente pas d'évolutions significatives dans le temps hormis le pic observé en mars 2010. Une forte chute est pourtant observée en décembre 2009 ($13,2 \pm 2$).

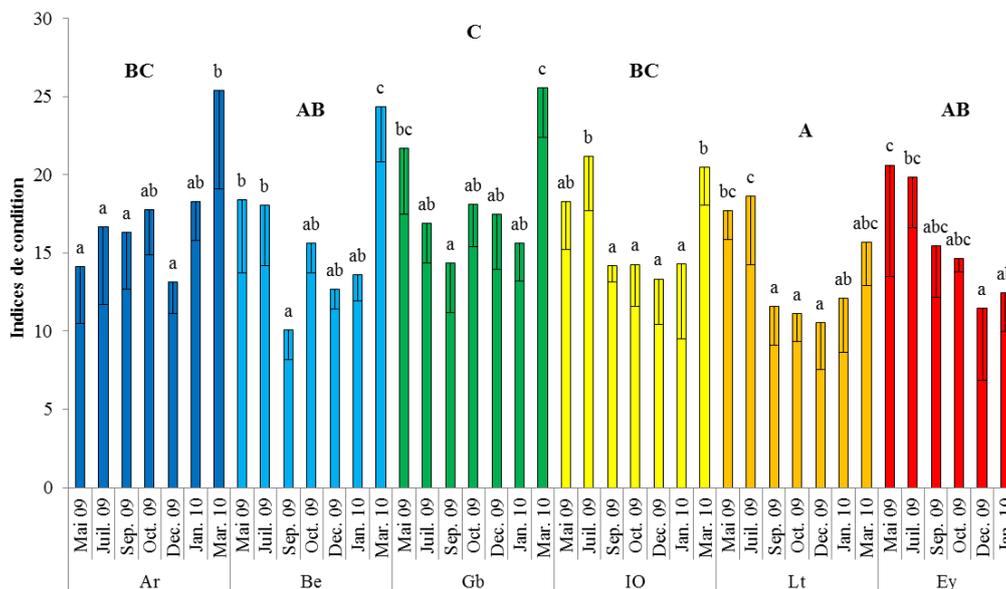


Figure 37 : Indices de condition des huîtres cultivées prélevées durant la deuxième année du programme ASCOBAR

2.2.2. La bioaccumulation métallique

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn) et le cadmium (Cd) ont été dosés dans les branchies, les glandes digestives et les restes des corps mous des huîtres. Les données suivantes représentent les concentrations moyennes de 5 échantillons en $\mu\text{g/g}$, poids sec \pm les erreurs standards (seules les moitiés inférieures sont représentées pour favoriser la lisibilité). Des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) suivis de tests post-hoc de Conover Iman (XLSTAT 2013) ont été réalisés pour étudier l'effet temps au niveau de chaque site (lettres minuscules) et l'effet site sur l'année (lettres majuscules).

2.2.2.1. Le cuivre

Les concentrations mesurées dans les **branchies** sont présentées dans la Figure 38. Les sites les plus orientaux Ile aux oiseaux, Le Tès et Eyrac montrent les valeurs les plus élevées de manière globale, suivis de Bélisaire, puis Grand Banc et enfin Arguin. Aucune évolution temporelle significative n'est observable au niveau d'Arguin et Ile aux oiseaux.

Les valeurs obtenues au niveau de Bélisaire et Grand Banc présentent en revanche une forte augmentation entre mai 2009 (Be : $118,3 \pm 25,5 \mu\text{g/g}$, ps ; Gb : $176,6 \pm 7,2 \mu\text{g/g}$, ps) et juillet 2009 (Be : $359,9 \pm 18,3 \mu\text{g/g}$; ps ; Gb : $329,1 \pm 63,4 \mu\text{g/g}$, ps), puis une diminution jusqu'à la fin de la cinétique, significative en octobre 2009 à Grand Banc ($133 \pm 27 \mu\text{g/g}$, ps).

Les tendances observées à Le Tès et Eyrac sont proches, avec des valeurs stables en début de cinétique, puis une augmentation significative en janvier 2010 pour Le Tès ($585,7 \pm 37,7 \mu\text{g/g}$, ps) et en octobre 2009 pour Eyrac ($872,7 \pm 101,5 \mu\text{g/g}$, ps).

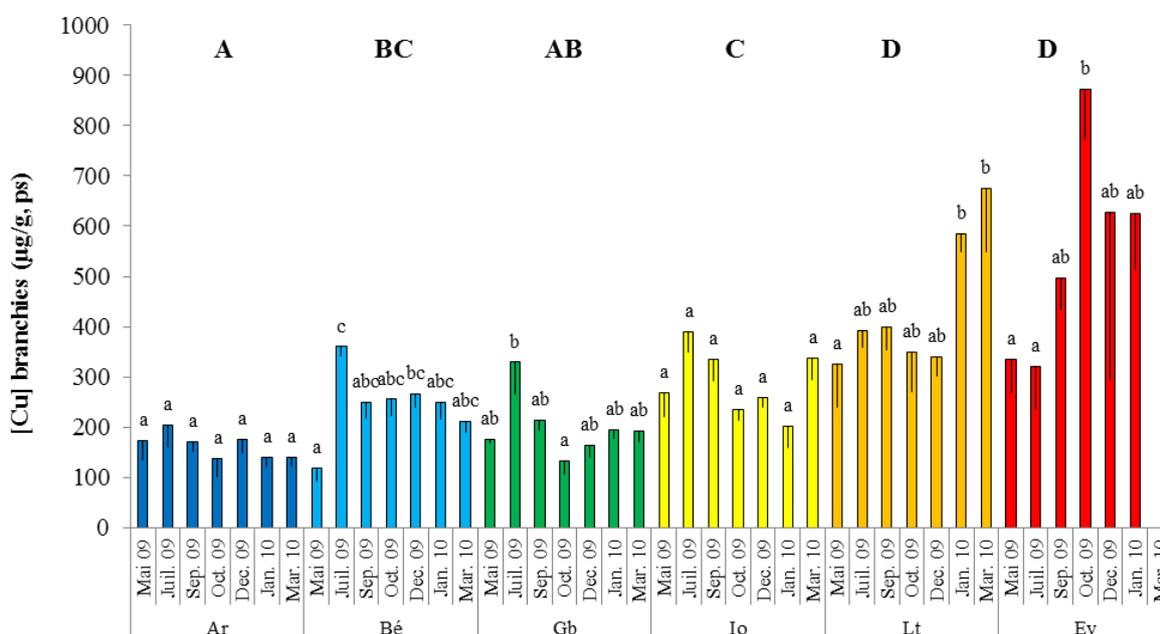


Figure 38 : Concentrations en cuivre mesurées dans les branchies des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR

Les différences entre stations sont plus marquées dans le cas de la **glande digestive** (Figure 39), mais le même schéma reste observable : les stations Le Tès et Eyrac présentent des valeurs moyennes significativement supérieures à celles observées au niveau de Arguin, Bélisaire, Grand Banc et Ile aux oiseaux. Les stations présentant les concentrations les plus fortes présentent encore des tendances similaires, et proches de celles déjà observées dans les branchies. Les valeurs minimales observées en mai 2009 en début de cinétique (Lt : $143,1 \pm 23,0 \mu\text{g/g}$, ps ; Ey : $112,9 \pm 31,3 \mu\text{g/g}$, ps) précèdent une augmentation des valeurs jusqu'à atteindre un maximum en janvier 2010 (Lt : $463,8 \pm 67,8 \mu\text{g/g}$, ps ; Ey : $779 \pm 146 \mu\text{g/g}$, ps). Les concentrations mesurées à Ile aux oiseaux ne varient pas significativement dans le temps. Le site de Bélisaire ne présente pas d'évolution significative non plus, hormis en fin de cinétique avec un maximum atteint en janvier 2010 ($222,7 \pm 16,9 \mu\text{g/g}$, ps) et un minimum atteint en mars 2010 ($64,1 \pm 6,0 \mu\text{g/g}$, ps).

Arguin et Grand Banc présentent dans cet organe des variations similaires, avec un maximum en juillet 2009 (Ar : $204,9 \pm 43,4 \mu\text{g/g, ps}$; Gb : $160,1 \pm 23,0 \mu\text{g/g, ps}$) et une diminution successive pour atteindre un minimum en mars 2010 (Ar : $54,8 \pm 4,1 \mu\text{g/g, ps}$; Gb : $62,2 \pm 8,4 \mu\text{g/g, ps}$). Une diminution des valeurs est observable pour les deux sites après l'été, significative seulement à Grand Banc en octobre 2009 ($71,6 \pm 18,8 \mu\text{g/g, ps}$).

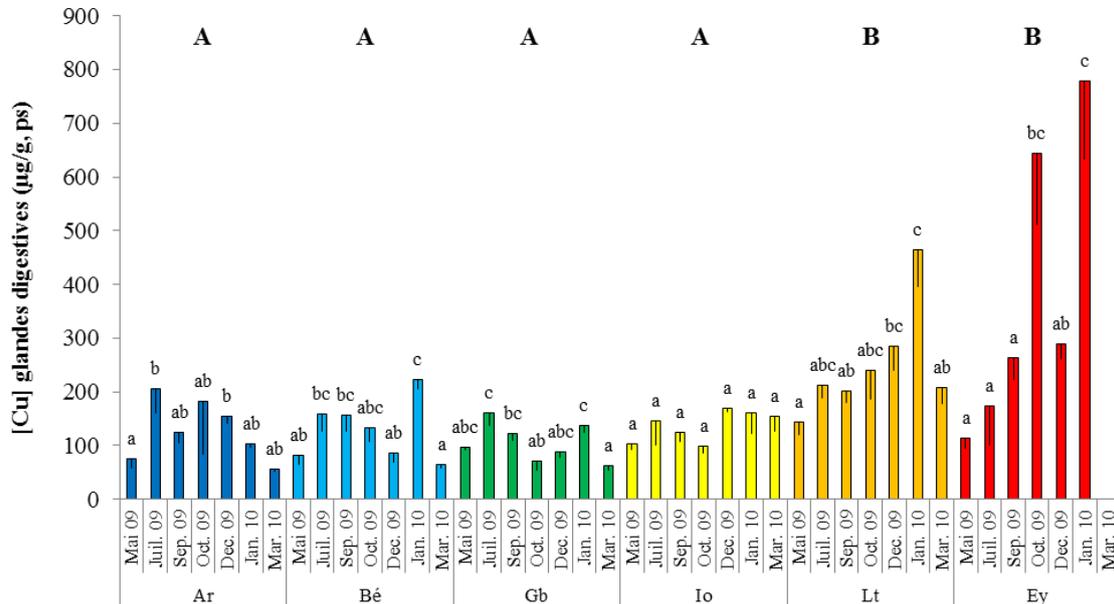


Figure 39 : Concentrations en cuivre mesurées dans les glandes digestives des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR

Les tendances observées dans les **restes des corps mous** (Figure 40) sont comparables à celles observées précédemment. Les stations Le Tès et Eyrac présentent encore les plus fortes valeurs moyennes sur l'année, suivies de Bélisaire et Ile aux oiseaux. Les deux sites les plus faiblement contaminés sont Arguin et Grand Banc. Les variations saisonnières sont encore non significatives au niveau d'Arguin et Ile aux oiseaux ; c'est également le cas à Grand Banc contrairement à ce qui a été observé auparavant dans les branchies et les glandes digestives. L'évolution des valeurs à Bélisaire est identique à celle observée dans la glande digestive, sauf concernant la mesure de septembre 2009 significativement plus forte que celle de mai 2009 pour cet organe ($185,7 \pm 15,5 \mu\text{g/g, ps}$). Le Tès et Eyrac présentent encore une augmentation significative en fin de suivi en comparaison au début de la cinétique, avec un maximum en janvier 2010 (Lt : $361,2 \pm 22,1 \mu\text{g/g, ps}$; Ey : $592,5 \pm 75,1 \mu\text{g/g, ps}$).

De manière générale concernant la bioaccumulation du cuivre dans les trois organes d'intérêt, on observe un effet important de la situation géographique. Les huîtres transplantées au niveau des stations Le Tès et Eyrac présentent les valeurs les plus importantes de manière systématique pour les trois organes. De plus, les branchies sont l'organe le plus contaminé avec des niveaux dépassant les $200 \mu\text{g/g, ps}$ durant presque toute l'année au niveau de Bélisaire, Ile aux oiseaux, Le Tès et Eyrac. Les glandes digestives peuvent présenter des niveaux similaires, mais principalement à Le Tès et Eyrac. Ce seuil de $200 \mu\text{g/g, ps}$ n'est en revanche presque jamais dépassé à Arguin et Grand Banc. On note également que les périodes présentant les valeurs les plus fortes sont juillet 2009 et janvier 2010.

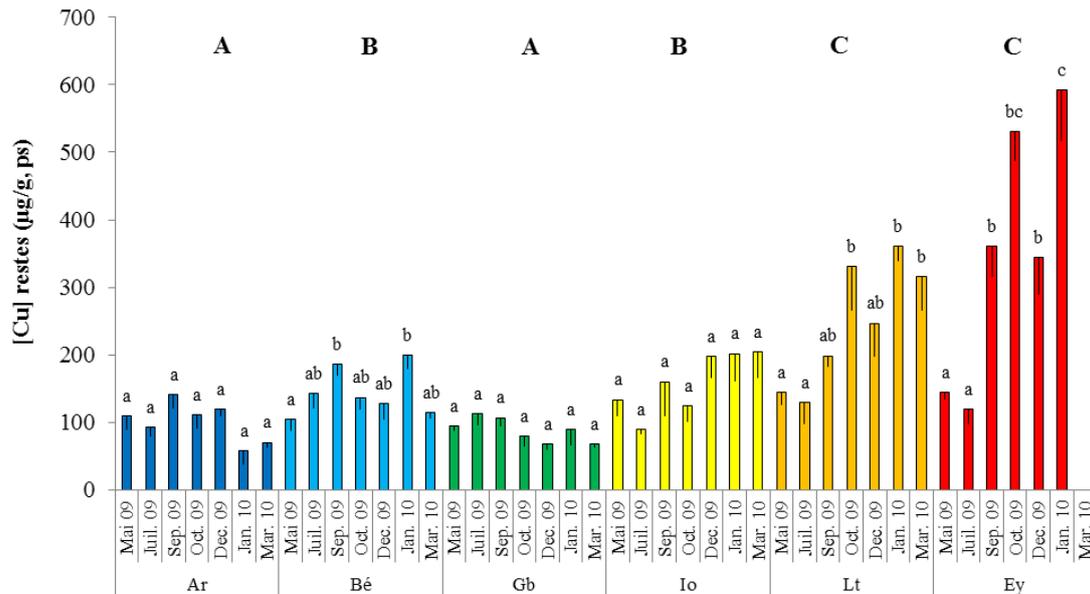


Figure 40 : Concentrations en cuivre mesurées dans les restes du corps mou des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR

2.2.2.2. Le zinc

Les variations entre sites concernant les bioaccumulations de zinc (Zn) dans les **branchies** sont présentées dans la Figure 41. Elles indiquent de manière globale une certaine homogénéité des niveaux atteints entre les différentes stations, à l'exception du site Le Tès qui se démarque positivement des autres sites. La station Ile aux oiseaux se place de façon intermédiaire entre Le Tès et les stations les moins impactées Arguin, Bélisaire, Grand Banc et Eyrac. Les tests statistiques réalisés au niveau de chaque station ont permis par ailleurs d'identifier une saisonnalité qui présente des caractéristiques commune entre certains sites. En dépit de fortes variations observées, l'importante variabilité inter-individuelle n'a ainsi pas permis de détecter de modifications significatives dans le temps à Le Tès et Eyrac.

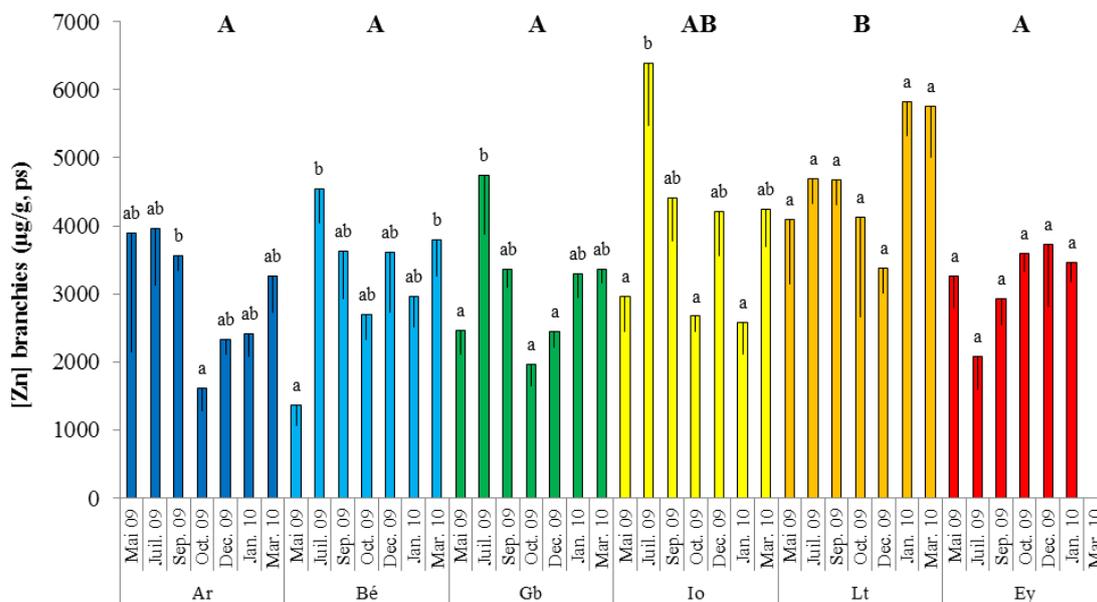


Figure 41 : Concentrations en zinc mesurées dans les branchies des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR

De fortes valeurs ont été mises en évidence en été au niveau d'Arguin (3559 ± 212 µg/g, ps) en septembre 2009 et de Bélisaire (4552 ± 505 µg/g, ps), Grand Banc (4735 ± 864 µg/g, ps) et Ile aux oiseaux (6396 ± 914 µg/g, ps) en juillet 2009. Ces pics observés précèdent des chutes de concentrations importantes en automne, significatives au niveau de Arguin, Grand Banc et Ile aux oiseaux en octobre (Ar : 1619 ± 340 µg/g, ps ; Gb : 1969 ± 329 µg/g, ps ; Io : 2671 ± 233 µg/g, ps). On notera également que le site de Bélisaire est le seul à présenter une accumulation significativement supérieure en fin de cinétique en comparaison au début (3793 ± 540 µg/g, ps).

Le constat est sensiblement différent dans la **glande digestive** (Figure 42). Les différences entre les stations sont encore marquées par des valeurs plus fortes au niveau de Le Tès. Les stations Arguin et Eyrac présentent des valeurs intermédiaires, proches de celles observées à Grand Banc et Ile aux oiseaux. Les plus faibles niveaux se retrouvent à Bélisaire. Encore une fois, les variations saisonnières observées à Ile aux oiseaux, bien qu'importantes ne sont pas significatives. Des valeurs supérieures aux autres ont cependant été mesurées au niveau des sites Bélisaire, Le Tès et Eyrac en janvier 2010 (Be : 2608 ± 370 µg/g, ps ; Lt : 4397 ± 681 µg/g, ps ; Ey : 4296 ± 764 µg/g, ps) à l'instar des observations faites pour le cuivre. Bélisaire présente cependant en plus un pic de concentrations en juillet/septembre 2009 (2080 ± 305 µg/g, ps) comme les stations Arguin et Grand banc (Ar : 3740 ± 683 µg/g, ps ; Gb : 2463 ± 537 µg/g, ps). De la même manière que pour les branchies, ces pics estivaux précèdent des chutes dans les concentrations significatives en mars 2010 pour Arguin (1114 ± 158 µg/g, ps) et en octobre 2009 pour Grand banc (1097 ± 248 µg/g, ps).

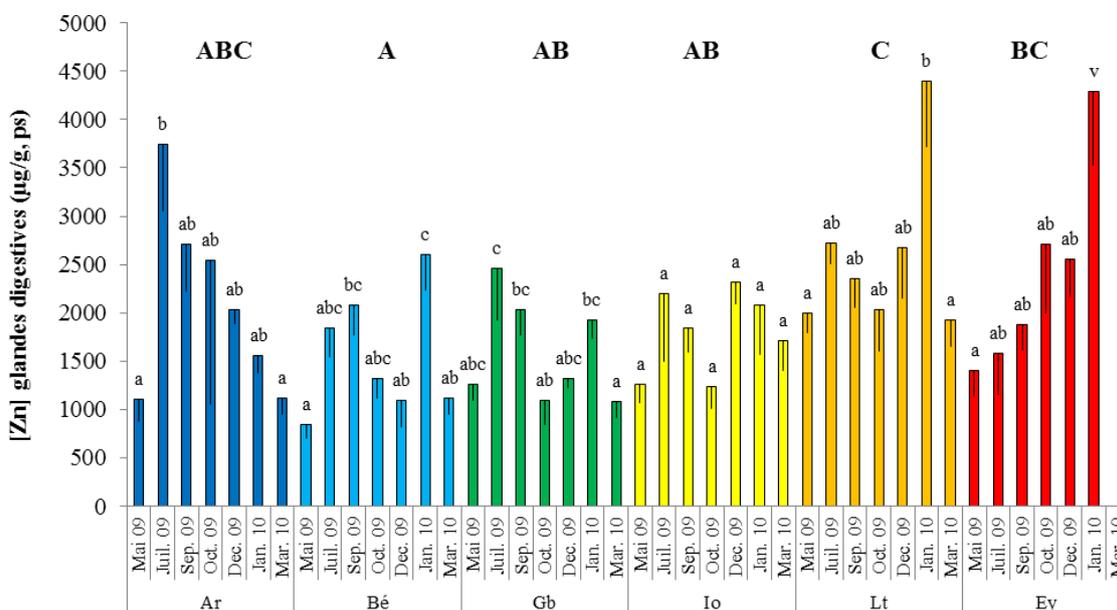


Figure 42 : Concentrations en zinc mesurées dans les glandes digestives des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR

Dans le **reste du corps mou**, les tendances entre stations sont en accord avec celles précédemment établies (Figure 43) pour les branchies et les glandes digestives. La station Le Tès se distingue encore d'Arguin, Bélisaire, Grand Banc et Ile aux oiseaux, tandis que le site d'Eyrac se positionne de façon intermédiaire. Le Tès et Eyrac présentent encore des valeurs significativement supérieures aux autres en janvier 2010 (Lt : 3638 ± 288 µg/g, ps ; Ey : 3571 ± 665 µg/g, ps), sans variations saisonnières notoires excepté en juillet 2009 à Eyrac (799 ± 150 µg/g, ps). L'augmentation de l'accumulation de

zinc en fin de suivi se retrouve également à Bélisaire ($2392 \pm 257 \mu\text{g/g ps}$) et Ile aux oiseaux ($2640 \pm 377 \mu\text{g/g, ps}$), ce qui n'était pas le cas précédemment. Les stations Grand Banc et Arguin en revanche ne présentent plus de variations significatives durant l'année de suivi, hormis un pic de concentration mesuré à Arguin en septembre 2009 ($3855 \pm 647 \mu\text{g/g, ps}$).

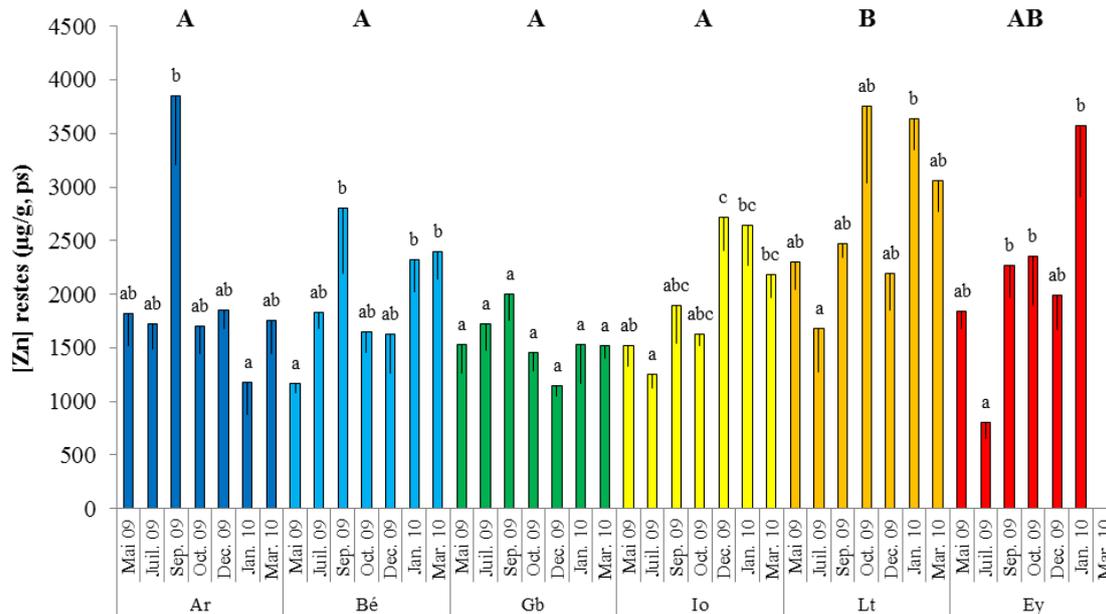


Figure 43 : Concentrations en zinc mesurées dans les restes du corps mou des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR

De manière globale, la station Le Tès présente les concentrations les plus élevées dans tous les organes étudiés. Eyrac dans une moindre mesure, montre également des valeurs de concentrations importantes. Ces tendances se rapprochent donc de celles précédemment observées pour le cuivre. Les variations saisonnières semblent décrire une hausse des valeurs en fin de cinétique pour les stations les plus orientale de Le Tès et Eyrac, et des pics estivaux en juillet/septembre 2009 pour les autres stations, principalement dans les branchies.

2.2.2.3. Le cadmium

Les concentrations en cadmium (Cd) dans les **branchies** sont présentées dans la Figure 44. Les deux sites les plus contaminés sont encore Le Tès et Eyrac, suivis d'Arguin et Bélisaire qui présentent des valeurs intermédiaires. Les stations Grand Banc et Ile aux oiseaux sont les moins touchées à l'échelle annuelle. En termes de variations saisonnières, aucune des stations d'étude ne présente d'évolution particulière dans le temps hormis Ile aux oiseaux dont les concentrations chutent drastiquement entre mai 2009 et octobre 2009 (de $1,84 \pm 0,11 \mu\text{g/g, ps}$ à $1,08 \pm 0,08 \mu\text{g/g, ps}$).

Les tendances s'inversent dans la **glande digestive** (Figure 45) puisque c'est la station d'Arguin qui se démarque des autres. Ensuite se positionnent Bélisaire et Grand Banc, puis Le Tès, Eyrac et Ile aux oiseaux. Aucune variation saisonnière n'est observable au niveau de Grand Banc et Le Tès. Les stations de Eyrac et Ile aux oiseaux en revanche, ont montré des chutes importantes des valeurs en juillet 2010 (Ey : $1,25 \pm 0,10 \mu\text{g/g, ps}$; Io : $1,13 \pm 0,09 \mu\text{g/g, ps}$), puis une reprise de l'accumulation jusqu'à la fin de la cinétique (Ey : $2,60 \pm 0,17 \mu\text{g/g, ps}$; Io : $2,15 \pm 0,37 \mu\text{g/g, ps}$). Les valeurs

mesurées à Bélisaire augmentent constamment dans le temps de mai 2009 à janvier 2010 (de $1,66 \pm 0,14 \mu\text{g/g}$, ps à $3,30 \pm 0,23 \mu\text{g/g}$, ps). Enfin la station Arguin présente un profil atypique avec un pic de contamination en juillet 2009 ($5,22 \pm 1,16 \mu\text{g/g}$, ps), puis une décroissance notable mais non significative jusqu'en fin de suivi ($2,69 \pm 0,15 \mu\text{g/g}$, ps).

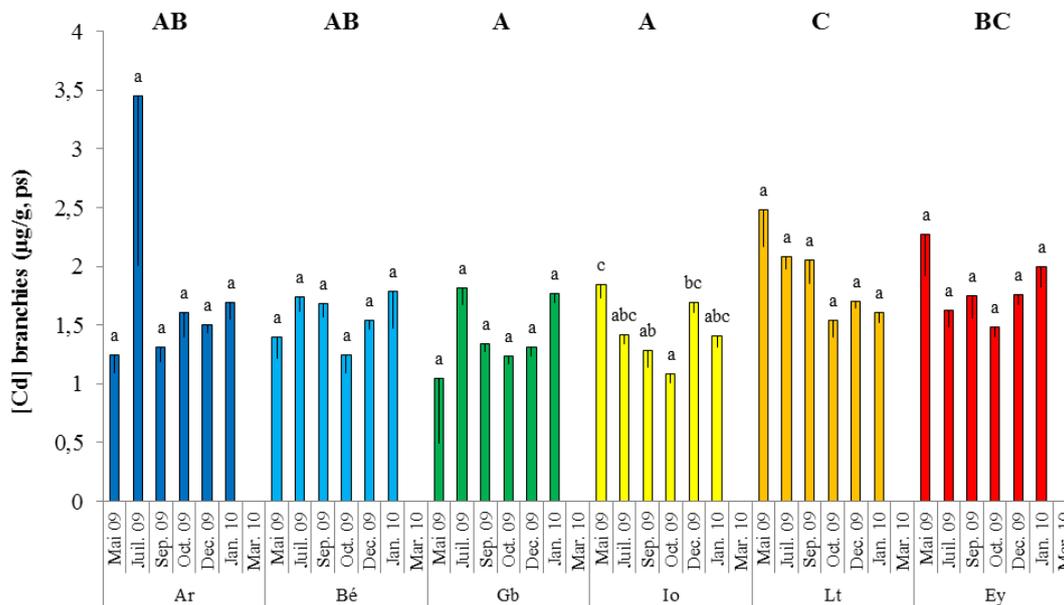


Figure 44 : Concentrations en cadmium mesurées dans les branchies des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR

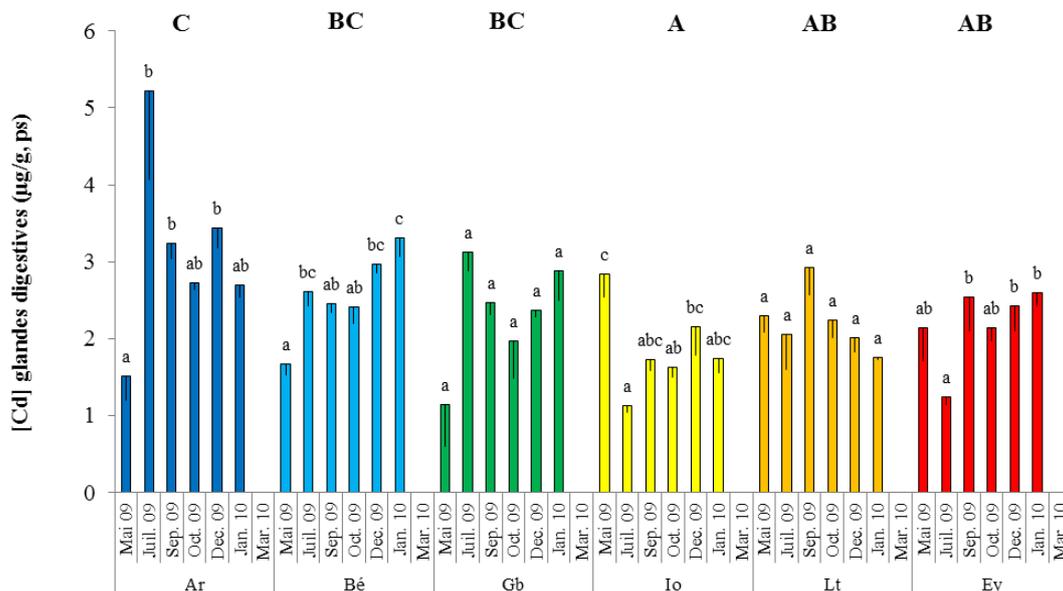


Figure 45 : Concentrations en cadmium mesurées dans les glandes digestives des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR

Dans les **restes du corps mou** (Figure 46), les tendances entre sites se rapprochent des observations déjà faites au niveau des branchies : la station Le Tès est la plus contaminée, suivies des stations Arguin, Bélisaire, Eyrac, et enfin les stations Grand Banc et Ile aux oiseaux présentent les valeurs moyennes annuelles les plus faibles. Concernant les variations saisonnières au niveau de chaque site, on confirme les tendances précédemment observées. La station Le Tès qui ne montrait aucune évolution significative présente désormais une décroissance entre mai 2009 et janvier 2010 (de $1,25 +$

0,05 µg/g, ps à 1,06 + 0,04 µg/g, ps). La chute estivale des concentrations observée plus haut à Ile aux oiseaux et Eyrac se retrouve encore (Io : 0,57 + 0,05 µg/g, ps ; Ey : 0,61 + 0,04 µg/g, ps), suivie d'une augmentation jusqu'en décembre 2009 / janvier 2010 (Io : 1,09 + 0,15 µg/g, ps ; Ey : 1,30 + 0,10 µg/g, ps). Ce phénomène s'observe à Bélisaire également, avec une hausse des concentrations entre juillet 2009 (0,65 + 0,05 µg/g, ps) et janvier 2010 (1,36 + 0,22 µg/g, ps). Grand Banc qui ne présentait pas de variations auparavant laisse apparaître désormais une différence significative entre les fortes valeurs de juillet 2009 (0,99 + 0,06 µg/g, ps) et les concentrations d'octobre 2009 (0,60 + 0,05 µg/g, ps). Le pic de concentration à Arguin en juillet 2009 est toujours observable (1,68 + 0,35 µg/g, ps).

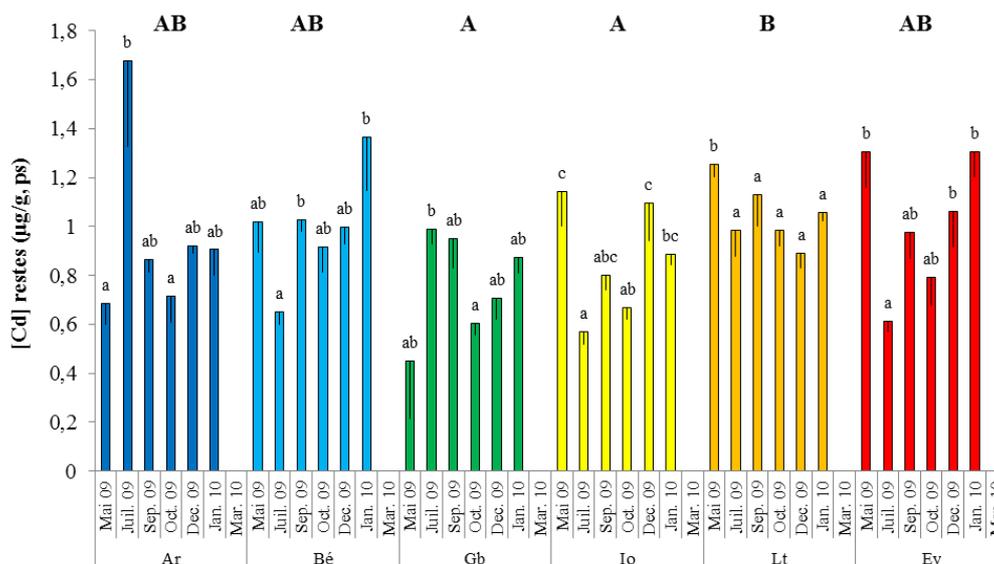


Figure 46 : Concentrations en cadmium mesurées dans les restes du corps mou des huîtres prélevées durant la seconde année du programme ASCOBAR

A l'instar des autres métaux, la station Le Tès se distingue encore une fois des autres sites. Cette tendance cependant s'inverse dans le cas de la glande digestive qui indique des accumulations maximales dans les sites les plus occidentaux Arguin, Bélisaire et Grand Banc. De manière générale, les concentrations en Cd ne présentent presque aucune variation saisonnière dans les branchies. Les glandes digestives et restes du corps mou permettent en revanche de mettre en évidence certaines tendances : des chutes de valeurs en juillet 2009 sauf à Grand Banc, suivies d'une reprise de l'accumulation, sauf à Le Tès qui conserve des niveaux équivalents.

2.2.3. Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Les graphiques suivants présentent les concentrations en HAPs obtenues dans les huîtres cultivées prélevées tous les 45 jours et dans les sédiments prélevés tous les 90 jours. Les valeurs correspondent à la somme des 16 HAPs prioritaires d'après l'US EPA. Puisque les analyses ont été réalisées sur des homogénats de 20 individus lyophilisés, et sur des échantillons de sédiments uniques, aucune barre d'erreur n'a pu être affichée. Des comparaisons entre stations ont pu être réalisées grâce au test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) suivi du test post-hoc de Conover-Iman (XLSTAT 2013).

2.2.3.1. Dans les huîtres cultivées

On observe tout d'abord que les trois sites les plus orientaux Ile aux oiseaux, Le Tès et Eyrac, et Bélisaire à l'entrée du bassin présentent les concentrations moyennes annuelles les plus élevées (Figure 47). Les valeurs maximales sont atteintes en décembre 2009 et janvier 2010 pour les stations internes (Io : 292,4 ng/g, ps ; Lt : 320,3 ng/g, ps ; Ey : 309,9 ng/g, ps), et les valeurs maximales sont atteintes en été pour Bélisaire (329,8 ng/g, ps). Les variations saisonnières observées à Grand Banc présentent également un pic estival en septembre 2009 (345,5 ng/g, ps) mais aussi des valeurs élevées en janvier 10 à l'instar des sites internes (239,5 ng/g, ps). La station Arguin en revanche montre peu d'évolution des concentrations dans le temps, et aucun pic n'est détectable.

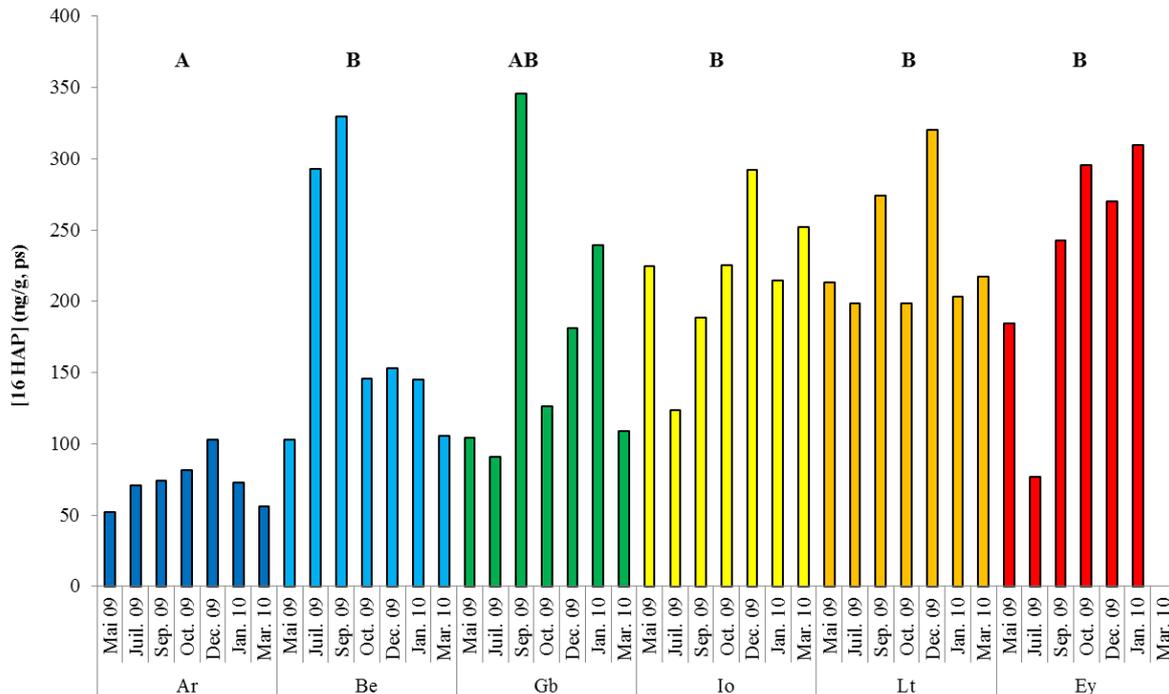


Figure 47 : Evolution des concentrations des 16 HAPs prioritaires dans les huîtres cultivées durant la seconde année du programme ASCOBAR.

2.2.3.2. Dans les sédiments

La station Ey n'est pas représentée ici car le programme ASCOBAR ne prévoyait pas la surveillance en HAPs de ses sédiments. De telles mesures ont été faites lors du programme OSQUAR. Les résultats obtenus dans les sédiments présentent une variabilité très importante (Figure 48). Pour cette raison, aucune tendance n'a pu être mise en évidence statistiquement entre les différents sites. On observe cependant que de fortes valeurs ont été obtenues comme en octobre 2009 à Le Tès (21719 ng/g, ps), Bélisaire (5897 ng/g, ps) ou juillet 2009 à Grand Banc (2095 ng/g, ps). Des valeurs extrêmement basses ont également été mesurées durant toute l'année au niveau de la station Arguin et de la station Grand Banc. A part ces quelques mesures extrêmes, on observe une certaine stabilité au niveau d'Ile aux oiseaux excepté en fin de suivi où les valeurs chutent (418 ng/g, ps).

Par ailleurs, les valeurs obtenues dans ces sédiments présentent une corrélation positive et significative ($p < 0,01$) avec les teneurs en carbone organique mesurées. En se basant sur les données de janvier et mars 2010, on obtient un coefficient de détermination R^2 (test de Pearson) de 0,733.

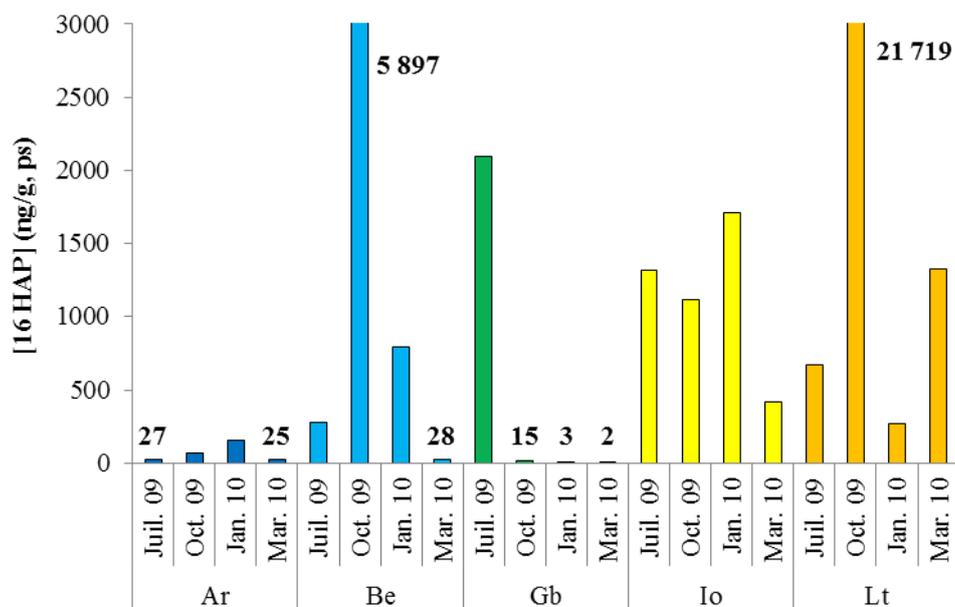


Figure 48 : Evolution des concentrations des 16 HAPs prioritaires dans les sédiments durant la seconde année du programme ASCOBAR.

2.2.4. La synthèse de métallothionéines

Les métallothionéines (MTs) ont été étudiées dans les branchies, la glande digestive et les restes du corps mou. Les valeurs représentées correspondent aux moyennes sur 5 individus \pm ET durant toute l'année de suivi et au niveau de chaque site. Les données ont été traitées comme pour les variables de croissances : lettres majuscules pour l'effet site général (ANOVA 2 facteurs « Temps * Site », $p < 0,05$) et lettres minuscules pour l'effet temps au niveau de chaque station (ANOVA 1 facteur « Temps »). Le test a posteriori utilisé est celui de la plus grande différence significative de Tuckey « post hoc Tuckey HSD » (XLSTAT 2013).

Les résultats concernant les **branchies** sont présentés dans la Figure 49. Les stations Le Tès et Eyrac présentent les valeurs les plus élevées de manière globale. Bélisaire présente des concentrations intermédiaires, et les stations Arguin, Grand Banc et Ile aux oiseaux présentent les niveaux globaux les plus bas. Au niveau saisonnier aucune évolution significative n'est observable à Arguin. Une augmentation significative des valeurs durant l'été est observable dès juillet 2009 pour Bélisaire (19 ± 8 nmol Hg/g, pf) et septembre 09 pour Eyrac (32 ± 7 nmol Hg/g, pf). Cette hausse des valeurs est observable également à Grand Banc, Ile aux oiseaux et Le Tès, où elle devient significative dès octobre 2009 pour Grand Banc (16 ± 5 nmol Hg/g, pf), septembre 2009 pour Le Tès (20 ± 2 nmol Hg/g, pf) et décembre 2009 pour Ile aux oiseaux (24 ± 14 nmol Hg/g, pf). Un pic important de production est observable en septembre 2009 pour les stations Bélisaire et Eyrac (Be : 28 ± 5 nmol Hg/g, pf ; Ey : 32 ± 7 nmol Hg/g, pf). Ces pics précèdent des chutes des valeurs notamment en janvier 2010 à Bélisaire (9 ± 5 nmol Hg/g, pf), Grand Banc (11 ± 5 nmol Hg/g, pf) et Le Tès (17 ± 4 nmol Hg/g, pf), ainsi qu'en octobre 2009 pour Eyrac (19 ± 5 nmol Hg/g, pf).

Les mesures dans la **glande digestive** (Figure 50) indiquent que les huîtres d'Eyrac ont les concentrations les plus élevées. Les concentrations moyennes observées à Arguin et Le Tès présentent des niveaux un peu plus faibles, puis les stations de Bélisaire, Ile aux oiseaux et Grand Banc montrent

les niveaux les plus bas. Tous les sites étudiés présentent des variations saisonnières significatives. De fortes hausses des valeurs sont observables partout, dès juillet 2009 pour Bélisaire (47 ± 10 nmol Hg/g, pf), septembre 2009 pour Eyrac (67 ± 4 nmol Hg/g, pf), octobre 2009 pour Le Tès et Ile aux oiseaux (Lt : 61 ± 3 nmol Hg/g, pf ; Io : 45 ± 6 nmol Hg/g, pf), décembre 2009 pour Arguin (76 ± 16 nmol Hg/g, pf) et janvier 2010 pour Grand Banc (53 ± 12 nmol Hg/g, pf). A l'instar des branchies, de fortes chutes sont observées à la suite de ces pics de synthèse.

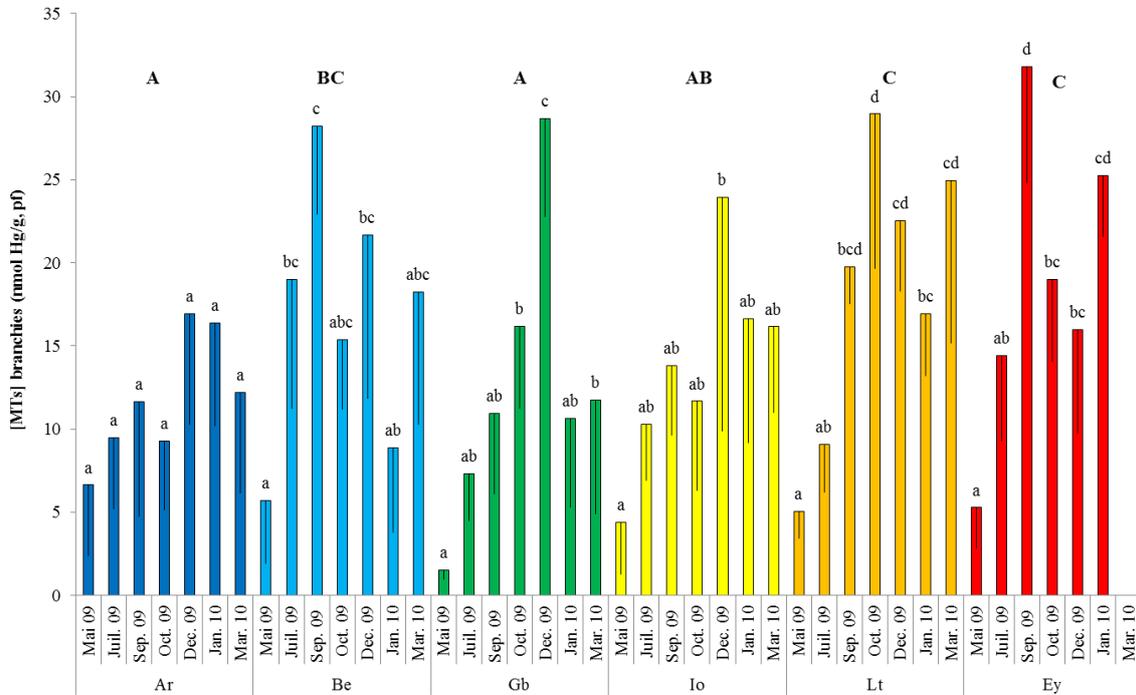


Figure 49 : Evolutions des concentrations en métallothionéines dans les branchies des huîtres cultivées de la seconde année du programme ASCOBAR

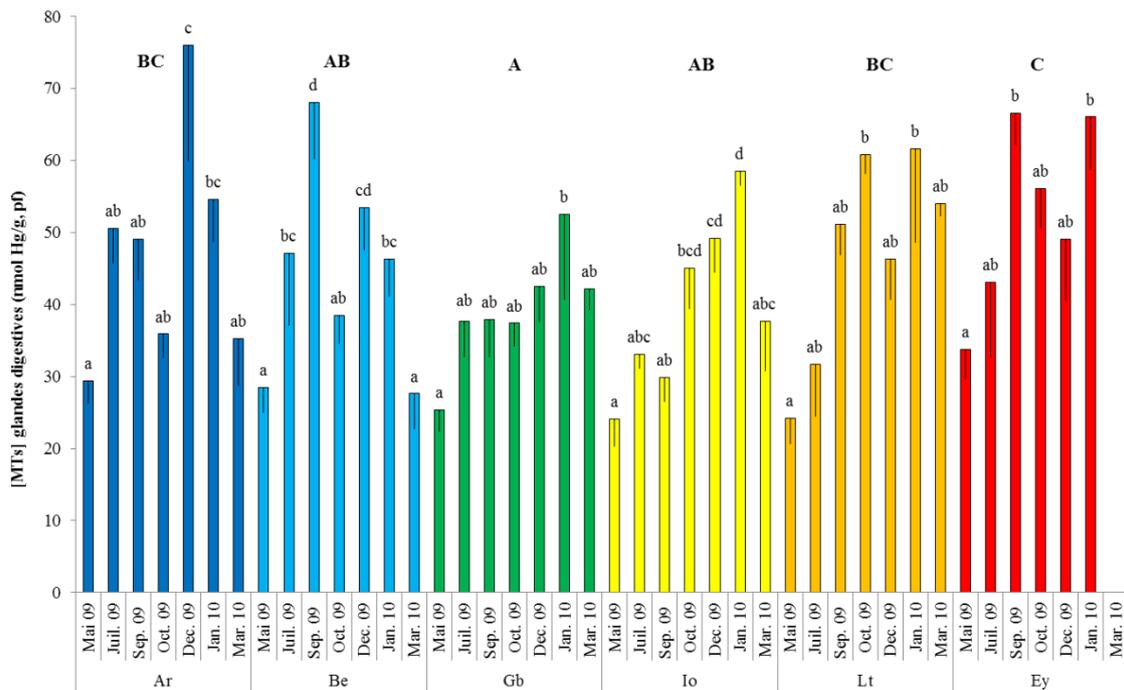


Figure 50 : Evolutions des concentrations en métallothionéines dans les glandes digestives des huîtres cultivées de la seconde année du programme ASCOBAR

Les variations observées au niveau des **restes du corps mou** (Figure 51) sont cohérentes avec les résultats obtenus dans les organes précédents. La station Le Tès présente les niveaux moyens annuels les plus élevés, suivie d'Arguin et Bélisaire, puis de Grand Banc, Ile aux oiseaux et Eyrac qui présentent les niveaux les plus bas. En termes de variations saisonnières, les stations Arguin, Grand Banc et Eyrac, en dépit de modulations importantes, ne présentent pas d'évolutions significatives dans le temps. Les valeurs obtenues à Ile aux oiseaux et Le Tès augmentent en revanche constamment jusqu'à atteindre un maximum significatif en fin de cinétique en mars 2010 (Io : 22 ± 7 nmol Hg/g, pf ; Lt : 28 ± 2 nmol Hg/g, pf). La station Bélisaire enfin ne présente qu'un pic de concentrations en juillet 2009 (27 ± 10 nmol Hg/g, pf).

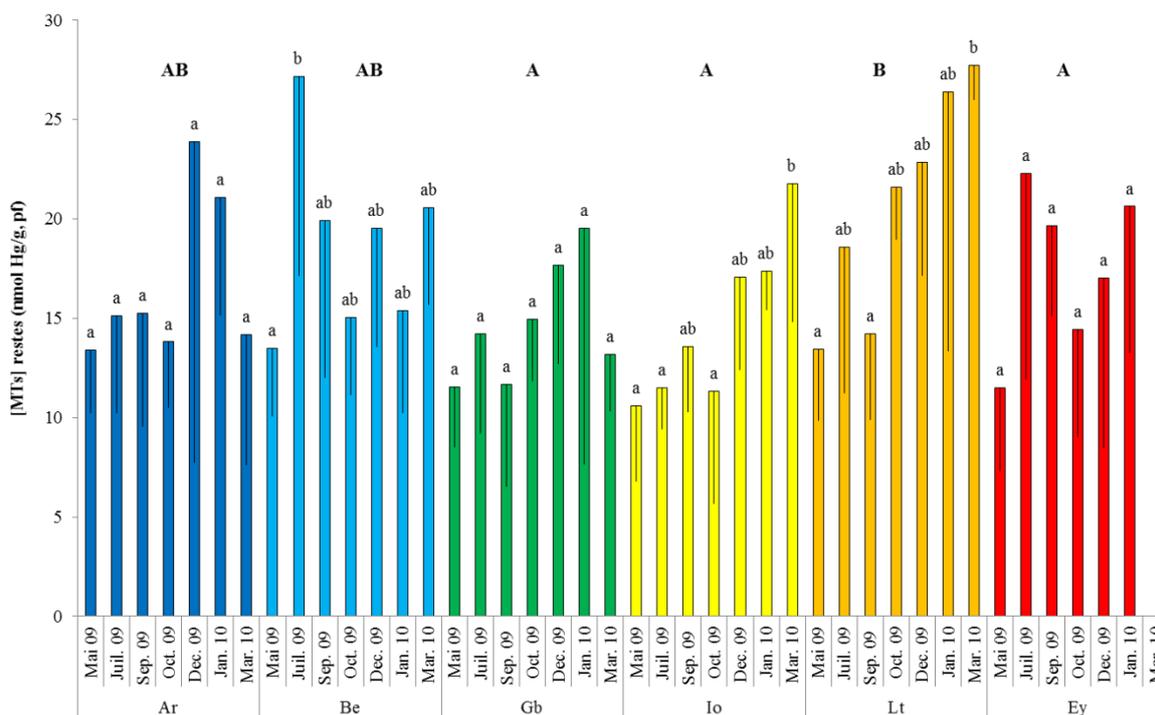


Figure 51 : Evolutions des concentrations en métallothionéines dans les restes du corps mou des huîtres cultivées de la seconde année du programme ASCOBAR

2.2.5. Les expressions géniques relatives

Les expressions géniques relatives des 9 gènes étudiés dans les branchies et les glandes digestives des huîtres prélevées sur le terrain sont présentées dans les Figure 52 et Figure 53. Les barres représentent les valeurs moyennes \pm l'erreur standard des 5 individus prélevés à chaque point cinétique. Les lettres en minuscules permettent à chaque temps de prélèvement de discriminer l'effet site. Les marqueurs reliés par un trait noir représentent les moyennes \pm l'erreur standard à chaque temps, tous sites confondus. Les lettres en majuscules permettent d'observer la saisonnalité des expressions géniques en comparant ces valeurs moyennes. L'absence de lettres en majuscule indique une absence d'effet temps sur l'ensemble des stations étudiées. Les comparaisons ont été réalisées par des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) suivis de comparaisons multiples post hoc de Conover-Iman (XLSTAT 2013).

2.2.5.1. Dans les branchies

De manière globale, de fortes variations saisonnières sont observables. Sur les 9 gènes étudiés, 6 présentent des augmentations significatives d'expression sur la période de l'automne et de l'hiver, dès septembre 2009 pour *gpx* et *gst*, puis à partir d'octobre 2009 pour *mxr*, *sod*, *mt1* et *sodmt*. Ces hausses sont pérennes dans le temps jusqu'en janvier 2010, hormis pour *gpx* qui présente une baisse en janvier. Ces 6 gènes, présentent des niveaux minimums d'expression sur la période estivale en mai 2009 pour *gpx*, juillet 2009 pour *gst*, *mxr*, *sod*, septembre 2009 pour *mt1*. Le gène *sodmt* est le seul à maintenir un niveau minimal de mai 2009 à septembre 2009.

Les différences inter-stations sont nombreuses et varient avec la période de l'année et le gène d'intérêt. Le mois de **mai 2009** est caractérisé par de fortes expressions à Grand Banc, notamment pour *gst* ($0,98 \pm 0,47$), *mt1* ($33,9 \pm 7,5$) et *mt2* ($87,7 \pm 21,2$). Arguin se distingue avec une forte expression de *cyp1a1* ($1,4 \pm 0,6$), Io avec *gpx* ($0,15 \pm 0,02$) et Lt avec *sod* ($0,11 \pm 0,04$). En **juillet 2009** c'est la station Ile aux oiseaux qui semble se démarquer avec des niveaux significativement plus élevés qu'ailleurs pour les gènes *gst* ($0,37 \pm 0,11$), *sod* ($0,05 \pm 0,006$), *mt1* ($5,16 \pm 2$) et *mt2* ($9,05 \pm 3,08$). Grand Banc présente toujours des niveaux élevés d'expression de *mt1* en juillet 2009 ($1,59 \pm 0,29$).

Les différences entre stations en **septembre 2009** ne présentent en revanche pas de dominance d'un site en particulier. Arguin et Ile aux oiseaux présentent des niveaux d'expression élevés pour *cyp1a1* (Ar : $0,50 \pm 0,13$; Io : $0,33 \pm 0,05$) et pour *mt1* (Ar : $0,61 \pm 0,18$; Io : $0,52 \pm 0,11$). Le gène *cyp1a1* est également fortement exprimé à Grand Banc ($0,55 \pm 0,16$), au même titre que *gpx* ($0,85 \pm 0,28$). Le gène *mt1* est de la même manière fortement exprimé au Tès ($2,85 \pm 1,85$). Ce site et la station Eyrac présente par ailleurs des niveaux d'expression de *mxr* significativement supérieurs (Lt : $0,079 \pm 0,031$; Ey : $0,004 \pm 0,001$). Le mois de septembre 2009 est la seule période de l'année durant laquelle un effet site est détectable pour le gène *cox1*, avec une dominance de Bélisaire ($201,17 \pm 80,78$).

Les stations Arguin et Ile aux oiseaux se distinguent en **octobre 2009** en présentant des expressions supérieures aux autres sites pour les gènes *gst* (Ar : $0,41 \pm 0,14$; Io : $0,64 \pm 0,31$), *mxr* (Ar : $0,21 \pm 0,09$; Io : $0,10 \pm 0,04$) et *sod* (Ar : $0,20 \pm 0,11$; Io : $0,54 \pm 0,27$). En décembre, seule la station Eyrac montre des valeurs supérieures aux autres sites, et seulement pour le gène *sodmt* ($0,95 \pm 0,15$).

Enfin, seuls 4 gènes présentent une hétérogénéité spatiale dans les expressions relatives pour le mois de **janvier 2010** : *mxr* avec des maximums pour Eyrac et Ile aux oiseaux (Ey : $1,32 \pm 0,86$; Io : $0,79 \pm 0,45$) ; *sod* avec des maximums pour Bélisaire, Grand Banc et Ile aux oiseaux (Be : $0,18 \pm 0,09$; Gb : $0,09 \pm 0,06$; Io : $0,40 \pm 0,20$) ; *cyp1a1* avec une dominance de Arguin et Ile aux oiseaux (Ar : $0,44 \pm 0,08$; Io : $1,29 \pm 0,56$) ; et *mt1* dominé par Eyrac ($35,66 \pm 17,77$).

On observe donc une chute des niveaux d'expression en été pour deux tiers des gènes étudiés (juillet 2009). Ces niveaux augmentent significativement après l'été pour atteindre leur maximum durant la période hivernale. La station Ile aux oiseaux présente souvent les niveaux d'expressions les plus hauts lorsqu'un effet site est détecté. Les stations Arguin et Grand Banc sont les deux sites les plus impliqués dans des niveaux d'expressions élevés après Ile aux oiseaux. Le mois de décembre ne présente presque aucune différence inter-station.

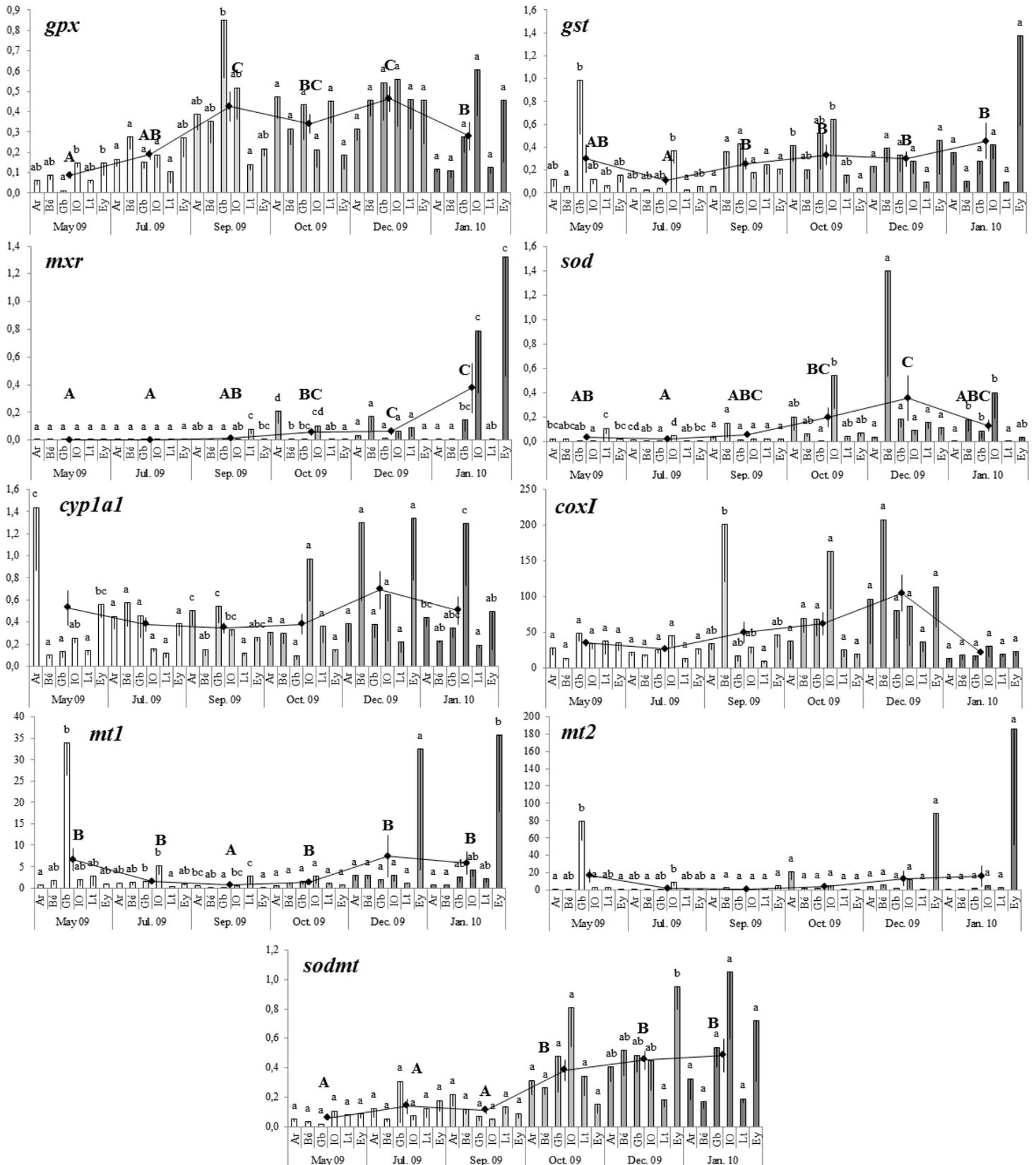


Figure 52 : Evolution des expressions géniques relatives de 9 gènes de stress dans les branchies des huîtres cultivées de la deuxième année du programme ASCOBAR

2.2.5.2. Dans la glande digestive

Les **variations saisonnières** observées dans la glande digestive (Figure 53) présentent des tendances communes avec celles des branchies. Des expressions minimales en juillet 2009 et maximales en décembre 2009 / janvier 2010 pour les gènes *mxr* et *sodmt* sont observables. Le gène *gpx* présente des résultats similaires avec cependant un pic d'expression en juillet 2009. Une autre dynamique est caractérisée pour les gènes *mt1*, *mt2* et *coxI* : de faibles niveaux en juillet 2009, suivis d'une hausse d'octobre 2009 à décembre 2009, puis d'une chute en janvier 2010. *Gst* et *cyp1a1* enfin, ne présentent aucune tendance notable, hormis une diminution forte des expressions en décembre 2009.

Le mois de **mai 2009** se caractérise par un niveau d'expression élevé à Arguin et Grand Banc de *gpx* (Ar : $0,089 \pm 0,007$; Gb : $0,003 \pm 0,001$) et *mxr* (Ar : $0,022 \pm 0,013$; Gb : $0,0003 \pm 0,0005$). Le gène *sod* est aussi fortement exprimé à Arguin ($0,434 \pm 0,293$), comme à Eyrac ($0,204 \pm 0,094$). Les gènes *gpx* et *mxr* sont aussi significativement exprimés à Ile aux oiseaux ($0,24 \pm 0,06$) pour le premier et Bélisaire pour le second ($0,0003 \pm 0,0001$). En **juillet 2009**, on observe des niveaux élevés à Grand Banc pour *gst* ($8,85 \pm 3,94$) et *coxI* ($159,48 \pm 23,07$). On notera également des niveaux élevés pour le gène *cyp1a1* à Arguin ($0,74 \pm 0,27$), Bélisaire ($0,866 \pm 0,266$), Le Tès ($0,514 \pm 0,132$), Eyrac ($0,417 \pm 0,098$) et pour le gène *sod* à Arguin ($0,030 \pm 0,008$) et à Ile aux oiseaux ($0,107 \pm 0,058$).

Les expressions géniques de **septembre 09** sont marquées par de fortes expressions relatives à Bélisaire et Grand Banc concernant les gènes *gpx* (Be : $0,27 \pm 0,12$; Gb : $0,05 \pm 0,07$), *sod* (Be : $0,154 \pm 0,109$; Gb : $0,11 \pm 0,06$), *cyp1a1* (Be : $0,876 \pm 0,277$; Gb : $0,80 \pm 0,14$), *coxI* (Be : $89,11 \pm 21,54$; Gb : $83,18 \pm 10,29$) et *mt2* (Be : $14,23 \pm 4,16$; Gb : $25,44 \pm 7,76$). La même observation est faite pour : (1) le gène *gpx* et le site Arguin ($0,20 \pm 0,02$) ; le gène *cyp1a1* et le site Ile aux oiseaux ($0,92 \pm 0,28$) ; le gène *gst* et le site Io ($1,31 \pm 0,74$). En **octobre 2009**, le gène *cyp1a1* est très exprimé à Arguin ($0,563 \pm 0,294$), Bélisaire ($1,06 \pm 0,227$), Ile aux oiseaux ($0,829 \pm 0,365$) et Le Tès ($0,36 \pm 0,06$). Le gène *mt2* présente un profil proche avec de hauts niveaux mesurés à Arguin ($99,11 \pm 41,75$), Bélisaire ($108,16 \pm 43,67$) et Eyrac ($31,06 \pm 14,51$). Les sites Ile aux oiseaux et Eyrac se démarquent concernant le gène *mxr* (Io : $0,0043 \pm 0,003$; Ey : $0,016 \pm 0,014$). Cette surexpression est assortie à Ile aux oiseaux de niveaux élevés d'expression du gène *sod* ($0,326 \pm 0,181$). Le gène *mt1*, en accord avec les observations faites pour l'autre isoforme, est surexprimé à Bélisaire ($39,3 \pm 12,1$).

En **décembre 2009**, seul le gène *sod* est exprimé différenciellement entre les différentes stations, avec des maximums significatifs à Bélisaire et Grand Banc (Be : $0,71 \pm 0,59$; Gb : $0,52 \pm 0,43$). Enfin en **janvier 2010**, la station Grand Banc se distingue encore par de hauts niveaux d'expression pour les gènes *mxr* ($0,92 \pm 0,39$), *sod* ($0,49 \pm 0,26$) et *sodmt* ($1,14 \pm 0,38$). *Mxr* est exprimé à des niveaux équivalents dans les stations Arguin ($0,14 \pm 0,06$) et Ile aux oiseaux ($0,61 \pm 0,34$).

Ces observations sont en accord avec celles faites dans les branchies. On observe des niveaux faibles en juillet 2009, et plus élevés en mai, octobre et décembre 2010. Le mois de janvier 2010 cependant se distingue avec de faibles niveaux d'expression pour *coxI*, *mt1* et *mt2*. Les sites les plus souvent cités lorsque des différences inter-stations ont été détectées, sont par ordre décroissant Grand Banc, Bélisaire, Arguin et Ile aux oiseaux.

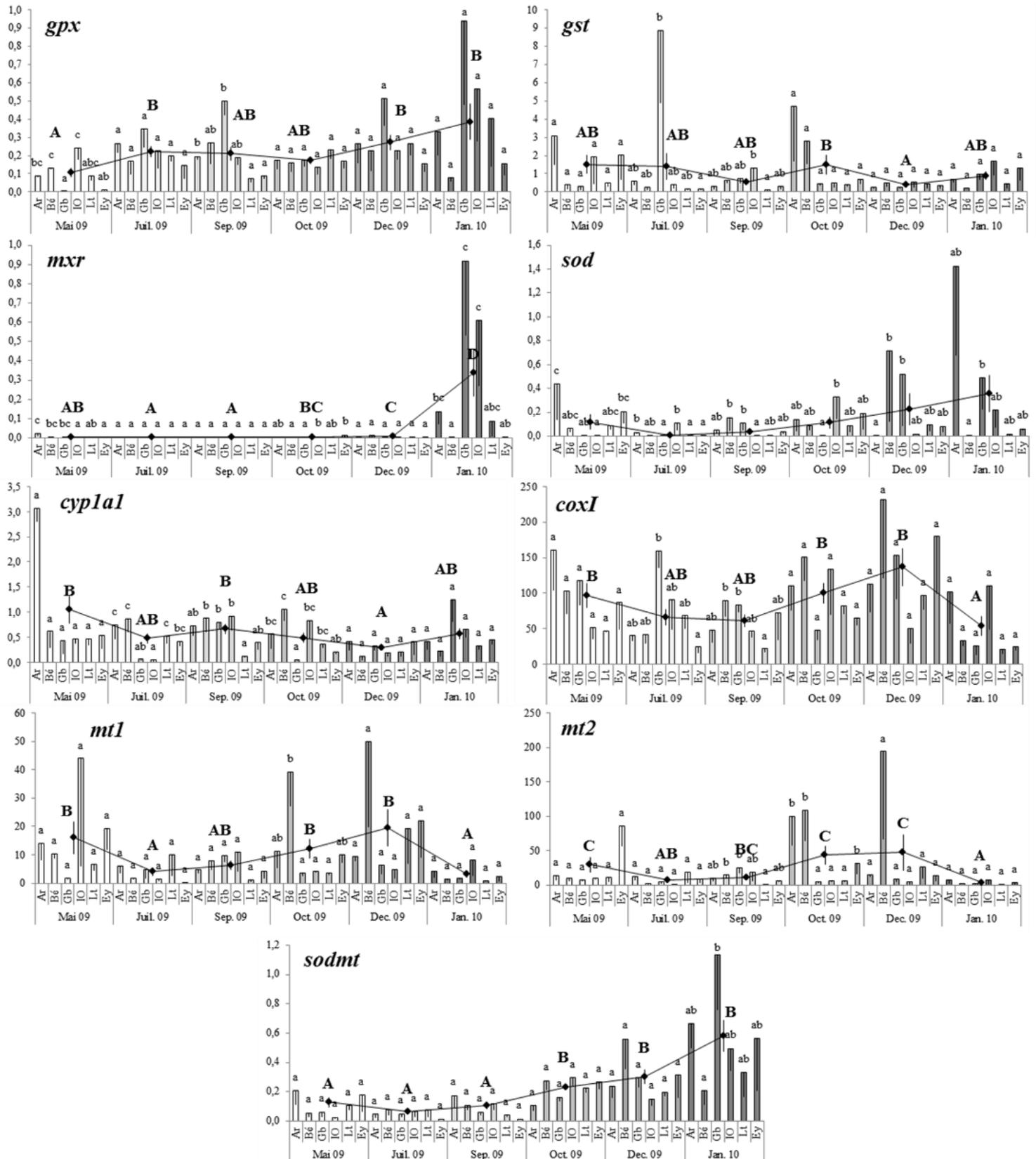


Figure 53 : Evolution des expressions géniques relatives de 9 gènes de stress dans les glandes digestives des huîtres cultivées de la deuxième année du programme ASCOBAR.

2.2.6. Physico-chimie du milieu

Les données relatives à la physico-chimie du milieu ont été récupérées grâce au Service d'Observation du Milieu LITtoral (SOMLIT : <http://somlit.epoc.u-bordeaux1.fr/fr/>). Les données de température, salinité, oxygène dissous, pH, matières en suspension et chlorophylle a dans l'eau ont ainsi été récupérées et moyennées pour chaque mois (n = 2) de mai 2009 à janvier 2010 (Tableau 12), et ce pour les deux stations les plus représentatives de nos sites d'études : Bouée 13 (entrée du bassin, proche de Arguin, Bélisaire et Grand Banc) et Eyrac (au niveau de la ville d'Arcachon, proche de Ile aux oiseaux, Le Tès et Eyrac).

Tableau 12 : Paramètres physico-chimiques 2009 - 2010 des eaux des stations Bouée 13 et Eyrac (SOMLIT)

Mois	T (°C)		S (psu)		O (mL/L)		pH		MES (mg/L)		Chla (µg/L)	
	Bouée 13	Eyrac	Bouée 13	Eyrac	Bouée 13	Eyrac						
Mai. 09	13,8	15,5	34,4	31,6	5,8	5,9	8,5	8,5	7,0	5,3	0,1	1,8
Juil. 09	19,5	22,4	34,8	33,7	5,4	4,9	8,2	8,2	2,8	2,6	0,7	1,2
Sept. 09	18,1	19,0	35,1	34,2	5,6	5,4	8,2	8,1	1,8	2,0	0,9	1,2
Oct. 09	15,5	15,3	35,3	34,6	5,9	6,0	8,2	8,1	2,4	1,6	1,7	2,4
Dec. 09	13,8	13,3	33,6	31,8	6,7	6,3	8,2	8,1	5,1	3,0	0,5	0,5
Janv. 10	10,1	8,6	33,6	30,0	6,6	6,8	8,1	8,1	3,8	3,4	1,2	0,9

On observe ainsi que le paramètre le moins discriminant pour ces deux zones est le pH avec des valeurs maximales en mai 2009 (8,5) qui décroissent jusqu'en janvier 2010 (8,1).

La température en revanche indique une amplitude de variation supérieure à Eyrac (8,6°C en hiver vs 22,4°C en été) par rapport à Bouée 13 (10,1°C en hiver vs 19,5°C en été).

L'oxymétrie est en rapport avec ces températures et indiquent donc des niveaux supérieurs à Eyrac en hiver (6,8 mL/L > 6,6 mL/L) mais supérieurs à Bouée 13 en été (5,4 mL/L > 4,9 mL/L).

De manière générale la salinité est toujours inférieure à Eyrac (de 30 psu en janvier 2010 à 34,6 psu en octobre 2009) en comparaison à Bouée 13 (de 33,6 psu en janvier 2010 à 35,3 en octobre 2009). Ce paramètre est maximal en été/automne et minimal durant la période hivernale.

Les MES présentent aussi des différences entre les deux zones étudiées avec des valeurs globalement supérieures à Bouée 13 (max : 7 mg/L en mai 2009 et 5,1 mg/L en décembre 2009) par rapport à Eyrac (max : 5,3 en mai 2009 et 3,4 mg/L en janvier 2010). Les valeurs semblent minimales de juillet à octobre mais élevées en hiver et en mai.

La chlorophylle a inversement, présente des valeurs systématiquement supérieures à Eyrac (octobre 2009 : 2,4 µg/L > 1,7 µg/L) hormis en janvier 2010 (0,9 µg/L < 1,2 µg/L).

2.2.7. Analyse en composantes principales (ACP)

Des ACP ont été réalisées pour les différents organes étudiés à partir des moyennes par site et par date de 14 variables (flèches rouges) : concentrations en HAPs, concentrations en Cu, Zn, Cd et MTs dans l'organe concerné, indices de conditions (IC), longueur de coquille (L), masse fraîche (M), température (T), salinité (S), oxygène (O), pH, matières en suspension (MES), chlorophylle a (Chla). Les données d'expressions géniques relatives ont été ajoutées en tant que données supplémentaires afin d'observer leur positionnement par rapport aux autres variables (flèches bleues). Les « individus » correspondent ici aux différents sites à chaque date de prélèvement (« Site Mois année »). Seuls les variables et les individus participant significativement à l'inertie des facteurs (contribution relative supérieure à la moyenne des contributions) et ayant une bonne qualité de représentation (cosinus carré maximal) sur au moins l'un des deux axes ont été représentés. L'éboullis des valeurs propres ainsi que les tableaux présentant les contributions relatives et les cosinus carré des variables et des individus sont présentés en annexes (Annexe 1).

2.2.7.1. Dans les branchies

L'ACP retenue pour cet organe a été réalisée à partir des facteurs 1 et 2, expliquant au total 47,69% de la variabilité de l'étude. L'étude du **cercle des corrélations** (Figure 54) et de la contribution des variables indiquent que le facteur 1 oppose les variables d'indice de condition (IC) et de pH aux variables de concentrations en HAPs (HAP), en MTs (MT), en oxygène dans l'eau (O) et à la longueur de coquille (L). Le facteur 2 en revanche oppose la concentration en oxygène dissous et en matières en suspension dans l'eau (MES) aux concentrations de cuivre (Cu) et zinc (Zn) dans les branchies, ainsi qu'à la température (T). Cette représentation graphique des variables dans un espace à 2 dimensions permet également d'observer les corrélations entre variables grâce à la proximité de leur représentation. On constate donc une corrélation entre : (1) HAP, MT ; (2) Cu et Zn ; (3) IC, pH et MES ; (4) L et O. De la même façon, une opposition des représentations graphiques indique une anti-corrélation, observable ici pour : (1) T et les variables L et O ; (2) les variables IC et pH et les variables MT et HAP ; (3) MES et Cu.

La **matrice des corrélations** (Tableau 13) confirme les observations graphiques réalisées précédemment et souligne des corrélations significativement positives moins évidentes graphiquement entre : (1) HAP et L ; (2) T et IC ; (3) O et MES. De la même façon, des anti-corrélations significatives sont observables dans cette matrices entre : (1) O et IC ; (2) MES et HAP, Cu, MT et T.

En ce qui concerne les **variables passives** d'expression génique, des relations significatives apparaissent également en dépit d'une moins bonne qualité de représentation. L'expression de *sodmt* paraît ainsi significativement corrélée à celle des quatre autres gènes ainsi qu'à la variable L. Des relations positives apparaissent également entre les variables de : (1) concentration en oxygène dissous dans l'eau et *mxr*, *sod*, *sodmt* ; (2) HAP et *gpx*, *mxr*, *sodmt* ; (3) *gst* et *mxr* ; (4) *gpx* et MT. A l'inverse des oppositions paraissent entre : (1) IC et *gpx*, *sodmt* ; (2) T et *gst*, *mxr*, *sodmt* ; (3) pH et *gpx*, *sodmt* ; (4) MES et *gpx*.

Tableau 13 : Matrice des corrélations de Pearson - Analyse en Composantes Principales appliquées aux variables des branchies (ASCOBAR année 2).

Variables	HAP	Cu	Zn	MT	IC	L	T	O	pH	MES	<i>gpx</i>	<i>gst</i>	<i>mxr</i>	<i>sod</i>	<i>sodmt</i>
HAP	1	0,27	0,12	0,51	-0,36	0,40	-0,18	0,29	-0,58	-0,42	0,56	0,20	0,37	0,11	0,45
Cu	0,27	1	0,47	0,31	-0,29	-0,22	0,02	-0,03	-0,30	-0,34	-0,09	0,03	0,19	-0,11	0,04
Zn	0,12	0,47	1	0,06	-0,19	-0,31	0,28	-0,28	-0,19	-0,27	-0,13	-0,22	-0,10	-0,09	-0,22
MT	0,51	0,31	0,06	1	-0,59	0,27	-0,10	0,24	-0,65	-0,43	0,47	0,14	0,23	0,18	0,28
IC	-0,36	-0,29	-0,19	-0,59	1	-0,17	0,35	-0,41	0,51	0,33	-0,39	-0,05	-0,23	-0,26	-0,34
L	0,40	-0,22	-0,31	0,27	-0,17	1	-0,39	0,47	-0,54	-0,23	0,22	0,15	0,23	0,24	0,44
T	-0,18	0,02	0,28	-0,10	0,35	-0,39	1	-0,93	0,03	-0,38	-0,09	-0,37	-0,46	-0,20	-0,51
O	0,29	-0,03	-0,28	0,24	-0,41	0,47	-0,93	1	-0,15	0,33	0,23	0,32	0,40	0,36	0,58
pH	-0,58	-0,30	-0,19	-0,65	0,51	-0,54	0,03	-0,15	1	0,72	-0,47	-0,09	-0,21	-0,17	-0,43
MES	-0,42	-0,34	-0,27	-0,43	0,33	-0,23	-0,38	0,33	0,72	1	-0,40	0,07	-0,02	0,09	-0,14
<i>gpx</i>	0,56	-0,09	-0,13	0,47	-0,39	0,22	-0,09	0,23	-0,47	-0,40	1	0,26	0,31	0,24	0,44
<i>gst</i>	0,20	0,03	-0,22	0,14	-0,05	0,15	-0,37	0,32	-0,09	0,07	0,26	1	0,66	0,17	0,47
<i>mxr</i>	0,37	0,19	-0,10	0,23	-0,23	0,23	-0,46	0,40	-0,21	-0,02	0,31	0,66	1	0,18	0,56
<i>sod</i>	0,11	-0,11	-0,09	0,18	-0,26	0,24	-0,20	0,36	-0,17	0,09	0,24	0,17	0,18	1	0,41
<i>sodmt</i>	0,45	0,04	-0,22	0,28	-0,34	0,44	-0,51	0,58	-0,43	-0,14	0,44	0,47	0,56	0,41	1

L'étude de la **projection des individus** (Figure 54), en lien avec leurs contributions respectives à l'inertie des axes et leur qualité de représentation permet d'opposer selon l'axe 1 : les 6 stations au mois de mai 2009 caractérisées par de fortes valeurs en IC et en pH, aux stations Ile aux oiseaux, Eyrac en janvier 2010, Ile aux oiseaux en décembre 2009 et Le Tès en octobre et décembre 2009 caractérisés par de fortes valeurs en MT, HAP, L et O. L'axe 2 en revanche, permet d'opposer : la période de juillet 2009 (Be, Io, Lt), septembre 2009 (Lt, Ey), octobre 2009 (Lt, Ey) caractérisée par de fortes valeurs en Cu, Zn et T à la période de décembre 2009 (Ar, Be, Gb) et janvier 2010 (Ar, Be, Gb, Io) caractérisée par de fortes valeurs en O et MES. Puisque les seuls individus projetés sont ceux présentant les meilleures qualités de représentation, il devient possible de les regrouper grâce à leur proximité dans le plan factoriel. On voit ainsi apparaître **trois groupes** : le groupe 1 représentatif de la période de mai 2009, le groupe 2 représentatif de la période de juillet, septembre et octobre 2009 et le groupe 3 représentatif de la période de décembre 2009 et janvier 2010.

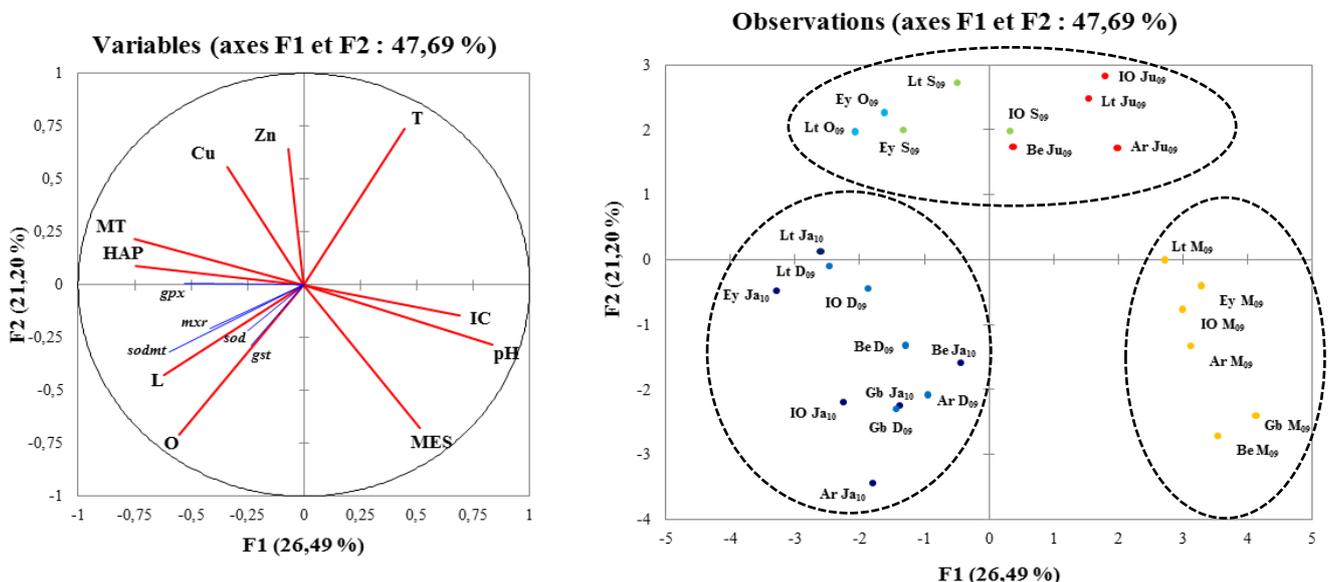


Figure 54 : Cercle des corrélations (à gauche) et projection des individus (à droite) - Analyse en Composantes Principales appliquée aux variables des branchies (ASCOBAR année 2)

2.2.7.2. Dans la glande digestive

L'ACP retenue pour cet organe (Figure 55) est basée sur les facteurs 1 et 2, expliquant 50,28% de la variabilité. De la même manière que précédemment, on peut déterminer en étudiant le **cercle des corrélations** et les contributions relatives des variables que l'axe 1 oppose : les variables de HAP, Cu, Zn, MT et O aux variables IC et pH. L'axe 2 en revanche, oppose les variables O, pH, MES aux variables T et salinité (S). Le facteur 1 est donc essentiellement constitué à partir des variables biotiques, et le facteur 2 à partir des variables environnementales. Visuellement, on constate des corrélations entre : (1) Cu, Zn, HAP et MT ; (2) S et T ; (3) pH et MES. De la même manière, on observe des anti-corrélations entre : (1) T, S et O ; (2) Cu, Zn, HAP, MT et pH, IC.

Les données de la **matrice des corrélations** dans le Tableau 14 confirment ces observations et permettent de détecter des corrélations supplémentaires moins évidentes telles que : (1) T et IC ; (2) O et MT ; (3) pH et IC ; (4) MES et O. A l'inverse, des anti-corrélations apparaissent : (1) Cu, Zn et S ; (2) O et IC ; (3) MES et HAP, Zn, MT, T.

Les **variables passives** d'expression génique relative en dépit d'une qualité de représentation moyenne, présente des relations significatives d'après le tableau 2. La variable O est significativement corrélée à l'expression de *gpx* et *sodmt*. Les niveaux d'expression de ces deux gènes sont d'ailleurs corrélés également, ainsi que : (1) HAP et *gpx* ; (2) pH et *cyp1a1* ; (3) MT et *sodmt*. Le pH est anti-corrélé à l'expression de *gpx*, la température à celle de *sodmt* et la bioaccumulation en zinc à celle de *mt1*.

La **projection des individus** dans le plan factoriel permet enfin au regard des contributions relatives à l'inertie des axes et des qualités des représentations de discriminer selon le premier facteur : (1) la station Le Tès en décembre 2009 et les stations Ile aux oiseaux, Le Tès, Eyrac en janvier 2010 présentant de fortes valeurs pour les variables HAP, Cu, Zn, et O et (2) les 6 stations étudiées en mai 2009 et Ile aux oiseaux en juillet 2009 présentant de fortes valeurs pour les variables IC et pH. De la même manière sur l'axe 2, on peut discriminer : (1) les 6 stations en mai 2009 et les stations Ile aux oiseaux, Le Tès et Eyrac en janvier 2010 présentant de fortes valeurs pour les variables O, pH, MES et (2) le mois de juillet 2009 (Io, Lt, Ey), de septembre 2009 (Lt, Ey) présentant de fortes valeurs pour les variables T et S.

Trois groupes d'individus se distinguent donc de par leur proximité dans le plan factoriel : le groupe 1 constitué des 6 stations d'intérêt au mois de mai 2009 ; le groupe 2 constitué des observations de juillet, septembre et octobre 2009 ; puis le groupe 3 constitué des observations de décembre 2009 et janvier 2010. Ces trois groupes sont les mêmes que ceux identifiés dans les branchies.

Tableau 14 : Matrice des corrélations de Pearson - Analyse en Composantes Principales appliquées aux variables des glandes digestives (ASCOBAR année 2).

Variables	HAP	Cu	Zn	MT	IC	T	S	O	pH	MES	<i>gpx</i>	<i>cyp1a1</i>	<i>mt1</i>	<i>sodmt</i>
HAP	1	0,36	0,32	0,45	-0,36	-0,18	-0,17	0,29	-0,58	-0,42	0,50	-0,29	-0,19	0,28
Cu	0,36	1	0,75	0,47	-0,37	-0,28	-0,40	0,23	-0,35	-0,28	-0,06	-0,23	-0,18	0,17
Zn	0,32	0,75	1	0,43	-0,36	-0,14	-0,37	0,11	-0,43	-0,39	0,12	-0,22	-0,33	0,06
MT	0,45	0,47	0,43	1	-0,63	-0,30	-0,15	0,41	-0,64	-0,37	0,26	-0,18	-0,20	0,38
IC	-0,36	-0,37	-0,36	-0,63	1	0,35	0,18	-0,41	0,51	0,33	-0,15	-0,06	-0,10	-0,24
T	-0,18	-0,28	-0,14	-0,30	0,35	1	0,56	-0,93	0,03	-0,38	-0,30	-0,06	-0,06	-0,68
S	-0,17	-0,40	-0,37	-0,15	0,18	0,56	1	-0,52	0,00	-0,26	-0,14	0,19	-0,09	-0,30
O	0,29	0,23	0,11	0,41	-0,41	-0,93	-0,52	1	-0,15	0,33	0,36	-0,07	0,17	0,68
pH	-0,58	-0,35	-0,43	-0,64	0,51	0,03	0,00	-0,15	1	0,72	-0,34	0,34	0,24	-0,31
MES	-0,42	-0,28	-0,39	-0,37	0,33	-0,38	-0,26	0,33	0,72	1	-0,10	0,27	0,25	0,09
<i>gpx</i>	0,50	-0,06	0,12	0,26	-0,15	-0,30	-0,14	0,36	-0,34	-0,10	1	0,07	-0,09	0,63
<i>cyp1a1</i>	-0,29	-0,23	-0,22	-0,18	-0,06	-0,06	0,19	-0,07	0,34	0,27	0,07	1	0,07	0,14
<i>mt1</i>	-0,19	-0,18	-0,33	-0,20	-0,10	-0,06	-0,09	0,17	0,24	0,25	-0,09	0,07	1	0,06
<i>sodmt</i>	0,28	0,17	0,06	0,38	-0,24	-0,68	-0,30	0,68	-0,31	0,09	0,63	0,14	0,06	1

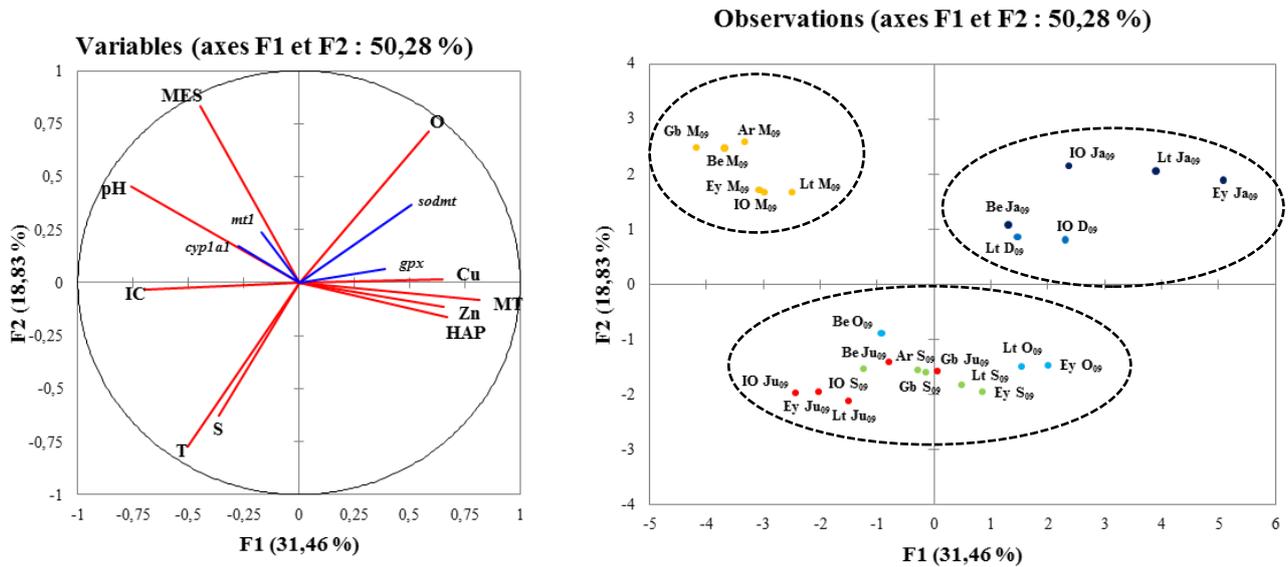


Figure 55 : Cercle des corrélations (à gauche) et projection des individus (à droite) - Analyse en Composantes Principales appliquée aux variables des glandes digestives (ASCOBAR année 2).

2.3. Discussion

L'approche *in-situ* mise en place ici comprend à la fois une variabilité spatiale (6 stations) et temporelle (une année de suivi). Le caractère « **multi-résidus** » et « **multi-compartiments** » de ces travaux confère de plus à cette étude une vue d'ensemble intéressante permettant de mieux comprendre la dynamique de la contamination chimique de l'hydrosystème Bassin d'Arcachon. Il est cependant connu que l'« hyper-variabilité » intrinsèque au milieu naturel peut représenter un obstacle dans l'interprétation des données (Beketov and Liess, 2012). Les paragraphes suivants s'attarderont donc à expliquer et discuter au maximum les résultats obtenus à la lumière des connaissances et des données de la littérature.

2.3.1. Croissance et reproduction des huîtres transplantées

Les paramètres de masse des organismes et de longueur de coquille étudiés cette année présentent une **hétérogénéité spatiale** marquée. Les stations les plus orientales du Tès et Eyrac, proches des eaux néritiques moyennes présentent en effet une absence de croissance presque totale, qui contraste fortement avec les importants gains de masse fraîche constatés au niveau des sites les plus externes de la lagune Arguin, Bélisaire et Grand Banc. Ces dernières stations se caractérisent notamment par un pic de croissance somatique en mars 2010, qui coïncide avec les augmentations de chlorophylle a dans les eaux du bassin. Les huîtres étant des organismes filtreurs, on peut donc raisonnablement faire un lien entre la présence de phytoplancton et leur croissance. La période printanière succède en effet à un repos hivernal (Royer et al., 2007) et se caractérise par une reprise de la croissance somatique à la faveur des floraisons printanières phytoplanctoniques et des augmentations des températures (Glé et al., 2008). Cependant les stations du Tès et de Eyrac ont également bénéficié de ce pic de production primaire en mars 2010, ce facteur n'est donc pas suffisant pour expliquer l'absence de croissance observée au niveau de ces deux sites. Les résultats de bioaccumulation métallique et en HAPs indiquent de manière globale que les deux stations présentant la croissance la plus faible sont également celles présentant les niveaux de contamination les plus forts. Un rôle de la contamination chimique de l'environnement dans la régulation de la croissance n'est donc pas à exclure, et a par ailleurs déjà été démontré par le passé sur des individus adultes (Bayen et al., 2007) comme chez des larves (Geffard et al., 2007). Le Tès est en effet situé près de l'agglomération d'Arcachon et de son port, impliquant une **pression anthropique** plus forte. Le site d'Eyrac est un embarcadère soumis au même type de pressions.

Les pics de croissance observés au niveau des sites d'Arguin, Bélisaire, Grand Banc et Ile aux oiseaux en fin de cinétique, se retrouvent dans les variations des IC. Cet indicateur varie avec la masse des organismes et permet de retracer notamment les pertes de masses brutales liées aux émissions gamétiques estivales. La température élevée en été est connue pour être le facteur prépondérant dans le déclenchement des pontes (Bernard et al., 2011; Meistertzheim et al., 2009). Ces épisodes sont par ailleurs tracés dans le Bassin d'Arcachon par le réseau IFREMER VelyGer, qui les situe autour du 20 juillet en 2009, ce qui est cohérent avec nos observations sur la plupart des sites étudiés (Maurer et al.,

2009). L'absence de chutes estivales significatives des IC à Arguin et Eyraç, peut être mise en lien avec des épisodes de « pontes partielles » moins détectables et plus répartis dans le temps. Les stations du Tès et d'Eyraç présentent ainsi un **effort de reproduction** notable à l'instar des autres sites, en dépit de croissances très faibles voire nulles.

2.3.2. La contamination des organismes transplantés

2.3.2.1. Par les métaux

De manière analogue, on observe une **hétérogénéité spatiale** concernant la contamination chimique des huîtres dans la lagune : les niveaux atteints sont globalement supérieurs au niveau des stations orientales. Dans un premier temps, des tendances similaires sont observables concernant le cuivre et le zinc avec des niveaux significativement supérieurs atteints au niveau du Tès et d'Eyraç dans les trois organes étudiés. Ce résultat s'explique par la localisation géographique des stations étudiées. L'île aux oiseaux, le Tès et Eyraç, se situent plus à l'est que les trois autres stations choisies, et sont donc plus proches des communes responsables en partie des rejets de ces métaux dans le milieu. Le cuivre par exemple, est de plus en plus utilisé dans les peintures anti-salissures des coques des bateaux depuis l'interdiction du tributylétain (Claisse et Alzieu, 1993). De plus, le Bassin d'Arcachon présente des caractéristiques hydrodynamiques particulières : le temps de rétention des eaux les plus internes est largement supérieur à celui des masses d'eau situées au niveau des passes, pouvant atteindre 14 jours (Plus et al., 2009). Les implications en termes de contamination sont importantes, car un temps de séjour supérieur indique un contact prolongé entre les organismes et les polluants, pouvant ainsi expliquer les niveaux importants atteints dans les stations concernées. Le cuivre par ailleurs, présente des concentrations supérieures dans les branchies en comparaison aux deux autres organes étudiés. Cette observation indique une contamination par voie directe, via les processus de respiration, ce qui est cohérent avec la spéciation du métal en eau salée Cu(II) sous forme d'ion libre ou chlorée (Byrne et al., 1988). Cependant, les études de terrain montrent que dans le milieu naturel, une très grande majorité du cuivre se complexe à des ligands organiques (acides humiques...) ou inorganiques (carbonates) moins disponibles par voie branchiale (Buck et al., 2007; Hall et Anderson, 1999). On peut donc en déduire que la contamination des organismes se fait également par voie trophique. Le cuivre a de plus le statut de métal essentiel (Festa et Thiele, 2011), et ses concentrations autant que son assimilation sont hautement régulés chez les eucaryotes (Balamurugan et Schaffner, 2006; Nevitt et al., 2012). Un transport potentiel entre le système digestif et les branchies a également pu avoir lieu, expliquant les concentrations supérieures obtenues dans cet organe.

Les résultats de la bioaccumulation en zinc présente des tendances similaires à celles observées pour le cuivre. Les sites du Tès et Eyraç se distinguent encore par rapport aux autres stations, pour les raisons exposées ci-dessus. Le zinc est un métal essentiel (Brandão-Neto et al., 1995; Salgueiro et al., 2000) impliqué dans l'activité de nombreuses enzymes (par exemple la superoxyde dismutase). A l'instar du cuivre, il se présente majoritairement sous forme complexée à des ligands organiques en eau salée (Ellwood and Van den Berg, 2000; Muller et al., 2001). On peut donc supposer que les voies de contamination du zinc sont proches de celles du cuivre, ce qui est par ailleurs corroboré par les

résultats de l'ACP qui corrèle de façon significative la bioaccumulation de ces deux métaux. Une des origines potentielles de ce métal dans l'eau, hormis sa présence naturelle dans le milieu, est l'utilisation des anodes sacrificielles en zinc dans le fonctionnement des bateaux pour éviter la corrosion de certaines parties métalliques (Mottin et al., 2012).

Les variations saisonnières observées au niveau de chaque station pour ces deux métaux répondent à de nombreux facteurs en interaction, rendant l'interprétation complexe. De façon générale, les processus impliqués dans la contamination métallique impliquent à la fois des facteurs biotiques tels que l'âge et le taux de filtration ainsi que des facteurs abiotiques en lien avec la température, le pH, l'hydrodynamisme, la présence de matière en suspension etc... Dans le cas présent, une forte variabilité est observable, mais certaines tendances peuvent être isolées : les diminutions de concentrations en Cu et Zn sur la deuxième moitié de la cinétique pour les sites Arguin, Bélisaire, Grand Banc et Ile aux oiseaux dans tous les organes peuvent par exemple être reliées à un phénomène de dilution pondérale. Ce phénomène résulte d'une augmentation de la masse de l'organisme (par la croissance) associée à une contamination faible du milieu. Dans le cas d'environnements non pollués, la bioaccumulation métallique et la masse de l'organisme tendent donc à évoluer de façon opposée, ce qui a déjà été observé lors de nombreuses études sur la bioaccumulation métallique (Bendell et Feng, 2009; Boyden et Phillips, 1981; Pérez-Osuna et al., 1995). L'ACP réalisée pour les branchies confirme par ailleurs cette hypothèse puisqu'une anti-corrélation significative a été détectée entre les variables de masses du corps mou et celles de concentrations en Cu et Zn dans les branchies. Les stations du Tès et d'Eyrac en revanche, présentent une augmentation globale dans le temps, assortie à une croissance somatique très faible ; cela exclut le phénomène de dilution pondérale et met en évidence la contamination supérieure du milieu au niveau de ces deux sites.

Les pics de contaminations observés en début de cinétique entre mai 2009 et juillet 2009 peuvent être associés au réchauffement des eaux. Jusqu'à 19°C, l'augmentation des températures entraîne une augmentation du taux de filtration des huîtres (Bougrier et al., 1995; Haure et al., 1998), ce qui a pu favoriser la contamination entre mai 2009 et juillet 2009. Cette période coïncide par ailleurs avec une activité métabolique importante liée à la reproduction. L'augmentation des besoins énergétiques associés a pu induire une augmentation de l'activité ventilatoire et une contamination supérieure des organismes en début de cinétique.

Les concentrations en Cd durant l'année de suivi présentent des tendances similaires au Cu et au Zn avec des valeurs moyennes maximales obtenues au Tès et à Eyrac dans les branchies, et au Tès dans les restes du corps mou. Ce résultat est probablement en lien avec la proximité entre ces stations et la commune d'Arcachon, puisque les principales sources de cadmium dans l'environnement proviennent de son utilisation (1) en revêtement de surfaces métalliques, (2) sous forme de pigment, (3) dans les batteries ou (4) en tant que stabilisateur dans certains plastiques (Bisson et al., 2011). Cette tendance est cohérente avec toutes nos précédentes observations, mais s'inverse dans la glande digestive, puisque la contamination en Cd de cet organe indique que les sites les plus occidentaux Arguin, Bélisaire et Grand Banc sont les plus impactés. Une hypothèse pouvant expliquer ce résultat atypique consiste en un apport estival de Cd par la nourriture, et donc potentiellement par la voie particulière.

Des travaux réalisés dans le nord du Pacifique ont déjà démontré que *C. gigas* pouvait potentiellement être contaminée par le Cd *via* la nourriture (Christie et Bendell, 2009). Cette voie a également été mise en évidence au laboratoire (Strady et al., 2011). Les moyens déployés dans notre étude ne permettent pas de tracer l'origine de ce cadmium, mais des travaux sur les contenus gastriques pourraient permettre de retracer des origines océaniques ou terrigènes du contaminant. En ce qui concerne les variabilités saisonnières pour ce métal, les tendances sont moins nettes que pour le Cu et le Zn. Aucune évolution significative n'est détectée dans les branchies sauf à l'Ile aux oiseaux où l'on peut observer les effets jusqu'en octobre de la dilution pondérale avant une reprise de la contamination due à l'arrêt de croissance en hiver. Dans la glande digestive en revanche comme dans les restes du corps, des schémas semblent se répéter et répondre aux variations d'indices de condition des organismes sauf à Bélisaire et Eyrac qui montrent de fortes valeurs en fin de suivi.

2.3.2.2. Par les HAPs

Ces contaminants sont des composés organiques relativement persistants largement répandus et bien connus pour leur toxicité à l'égard des organismes aquatiques (Bado-Nilles et al., 2008; Boutet et al., 2004a; Trisciani et al., 2011). Les observations faites pour ces polluants sont cohérentes avec celles faites précédemment pour les contaminations métalliques : l'hydrodynamisme moindre et la proximité du port d'Arcachon semblent favoriser l'accumulation de ces composés dans les huîtres étudiées au niveau du Tès et d'Eyrac comme cela a déjà été montré dans le passé pour les moules (Devier et al., 2005). Le potentiel de bioaccumulation des HAPs est par ailleurs renforcé par leur hydrophobicité importante. Cette caractéristique majeure les rend peu solubles dans l'eau (hormis les plus légers comme le naphthalène) et favorise leur complexation aux matières en suspension (Crespo, 2009) qui représentent le compartiment nutritif principal des huîtres (Baumard et al., 1998a; León et al., 2013). On peut donc émettre l'hypothèse d'une contamination majoritaire par voie trophique des organismes concernant ces polluants.

La station d'Arguin se présente encore comme un site de référence au regard des faibles niveaux observés dans les huîtres, ce qui est cohérent avec la faible contamination du sédiment mesurée à cette station. Le rôle du sédiment a déjà été mis en évidence dans la contamination des organismes aquatiques (Baumard et al., 1998b), ce qui se confirme au niveau de sites comme Arguin et dans une moindre mesure comme Ile aux oiseaux et le Tès. Un lien direct entre la contamination de ces deux compartiments ne peut cependant pas toujours être fait ici, notamment car les organismes étudiés ont été cultivés sur des tables ostréicoles, et n'ont donc pas été en contact direct avec le sédiment. De plus, le niveau de contamination de ce compartiment est directement corrélé au niveau de matière organique qu'il contient (Crespo, 2009). Certains sites tels que Bélisaire, Ile aux oiseaux ou le Tès présentent une forte hétérogénéité, avec des zones vaseuses riches en HAPs et des zones plus sableuses comme à Arguin présentant de faibles concentrations. Il est donc possible au regard de la faible prise d'essai employée pour les extractions de HAPs sur sédiment, que certaines valeurs surestiment ou sous-estiment le niveau réel moyen de l'échantillon. Ces valeurs indiquent cependant qu'en dépit d'une exposition à de forts courants de marée et à un brassage important des eaux (Plus et al., 2009), les

sédiments de sites tels que Bélisaire ou Grand Banc peuvent jouer le rôle de « puits à contaminants » comme les valeurs obtenues en juillet et octobre 2009 le montrent. Un relargage est donc possible en cas de remise en suspension du sédiment dans la colonne d'eau, et même si des organismes tels que les huîtres cultivées (sur table) ne présentent pas de contamination majeure, certains animaux benthiques endogés ou épigés ont de fortes probabilités d'être impactés par la contamination du compartiment sédimentaire (Geffard et al., 2003).

En dépit du fait que les analyses sur les huîtres aient été réalisées sur des échantillons uniques, on peut raisonnablement considérer que la valeur obtenue est représentative du niveau moyen de la population étudiée puisque 20 individus ont été réunis. On observe ainsi d'intéressantes variations des concentrations dans le temps au niveau des différentes stations, indiquant par ailleurs que les huîtres sont capables de dépurifier les HAPs (Rewitz et al., 2006) comme certaines chutes le montrent. On observe notamment deux pics de contamination en juillet / septembre 2009 au niveau des stations Bélisaire et Grand Banc, pouvant potentiellement être mises en lien avec la fréquentation nautique accrue du bassin durant la période estivale (Ifremer and LPTC, 2008; Le Berre et al., 2010).

De manière globale, la contamination des huîtres mesurée au niveau de la lagune reste inférieure aux seuils préconisés par l'AFSAA (500 ng/g, ps pour les 16 HAPs prioritaires de l'US EPA). On note cependant que les concentrations observées au niveau des stations orientales (autour de 300 ng/g, ps) s'en rapprochent et sont du même ordre de grandeur que celles observées dans des Grandes Nacres (bivalve endémique de la mer Méditerranée) prélevées 1 mois après le naufrage du Don Pedro en 2007 (~ 325 ng/g, ps; Sureda et al., 2013). Par ailleurs, malgré une hétérogénéité importante, les concentrations mesurées dans les sédiments présentent des valeurs « faibles » à « moyennes » du même ordre de grandeur que celles mesurées en 1998 par (Baumard et al., 1998b) à la sortie de l'estuaire de la Gironde (200 – 300 ng/g, ps) ou sur certains sites de la côte méditerranéenne espagnole (5 – 8 ng/g, ps). Une valeur particulièrement élevée au Tès dépasse cependant largement les concentrations maximales observées par cet auteur dans le port de Barcelone (8420 ng/g, ps). Il apparaît donc nécessaire de surveiller l'évolution de ces contaminants dans la lagune. En dépit de niveaux actuels modérés dans les huîtres et les sédiments, il est probable que l'urbanisation future de la région induise une augmentation des apports en HAPs.

2.3.3. Le suivi des biomarqueurs

2.3.3.1. Les concentrations en métallothionéines

Les MTs sont de petites protéines cytosoliques riches en cystéines, impliquées dans la séquestration des métaux non essentiels et l'homéostasie des métaux essentiels. Leur régulation et leur utilisation en tant que biomarqueurs de la contamination métallique ont été largement documentées chez les eucaryotes (Capdevila et al., 2012; Haq, 2003; Ruttkay-Nedecky et al., 2013; Wang et Rainbow, 2010). Il ressort de la majorité de ces études que les MTs sont inductibles par les métaux, mais par également de nombreux autres facteurs biotiques (hormones, ROS) et abiotiques (choc thermique, radiations...). L'interprétation de ces données doit donc être réalisée avec prudence et à la lumière des autres biomarqueurs employés dans l'étude. Les concentrations observées dans les branchies, les

glandes digestives et les restes du corps indiquent un lien potentiel avec la contamination chimique mesurée puisque les stations présentant les bioaccumulations les plus fortes sont aussi celles qui présentent les niveaux de MT les plus élevés (le Tès et Eyrac). La station Arguin pourtant peu contaminée de manière globale, se caractérise par de forts niveaux de MTs dans la glande digestive. Cette observation pourrait potentiellement être mise en lien avec les niveaux supérieurs de Cd qui y sont détectés en été. Cette hypothèse est corroborée par une corrélation significative entre les deux facteurs (Annexe 1). Les ACP réalisées indiquent de plus une corrélation significative entre la concentration en MTs et celle en HAPs dans les branchies, ainsi qu'une corrélation significative entre la concentration en MTs et celles de tous les contaminants étudiés dans la glande digestive. Ces constats et les différences inter-stations déjà présentées indiquent donc un lien entre la production de protéines et la contamination des huîtres par les métaux et les HAPs.

Des variations saisonnières sont également observables au niveau de la plupart des sites. Bien que les MTs soient connues pour être grandement influencées par les processus liés à la reproduction (Sheehan et Power, 1999), aucun pic de protéine ne précède l'émission gamétique de juillet. La seule station présentant ce type de résultats est celle de Bélisaire, dans les restes du corps. Cet « organe » contient en effet les gonades, qui chez *C. gigas* peuvent occuper une grande proportion de la masse totale de l'organisme en période de ponte. L'importante concentration de cette protéine dans cet organe peut expliquer l'observation faite à Bélisaire. Les autres stations, semblent en revanche présenter des évolutions saisonnières indépendantes de la reproduction en dépit d'un effort reproductif avéré (chutes des IC), ce qui peut probablement être mis en lien avec la bioaccumulation de contaminants et le stress oxydant qui y est lié.

2.3.3.2. Les expressions géniques relatives

Les niveaux d'expressions géniques relatives ont montré une variabilité inter-individuelle majeure. Les biomarqueurs géniques sont connus pour être des marqueurs précoces de contamination, mais leur rapidité de réponse peut être problématique sur l'exploitation de séries long terme. Dans les branchies ou la glande digestive, les différences entre les stations n'ont pas pu être mises clairement en évidence. De nombreux résultats significatifs ont été exposés, mais leur interprétation reste complexe dans le cadre de notre étude : il semble que de manière très globale les sites d'Arguin, Bélisaire, Grand Banc et de l'île aux oiseaux, présentent le plus souvent des expressions géniques supérieures lorsque des différences entre sites sont détectées. Un grand nombre de facteurs peut être à l'origine de ces différences dans la mesure où les gènes choisis dans cette étude sont des marqueurs de stress généraux et peuvent répondre au stress lié à une contamination comme à celui lié à un choc thermique. Dans un souci de clarté, l'extraction de tendances saisonnière par l'outil statistique présente donc un intérêt. Certains modèles saisonniers ont ainsi pu être mis en évidence et présente une cohérence entre les deux organes étudiés.

Le premier constat concerne les niveaux d'expression minimaux observés dans les deux organes en juillet 2009. Hormis *gpx* dans la glande digestive et *mt1* dans les branchies, le mois de juillet 2009, correspondant à la période de ponte, présente les niveaux géniques les plus faibles. Cette observation

paraît contre-intuitive puisque la gamétogenèse et la ponte sont connus comme étant des événements hautement stressants et coûteux en énergie (Cotter et al., 2010), nécessitant en théorie une protection antioxydante forte. De faibles niveaux transcriptomiques en été peuvent trouver une explication en s'appuyant sur les travaux de Fleury et collaborateurs (Fleury et Huvet, 2012; Huvet et al., 2010). Les études menées sur des lignées résistantes et sensibles aux mortalités estivales, ont montré de faibles réponses antioxydantes dans le cas des huîtres sensibles. Ces observations sont en accord avec la théorie de Samain (Samain, 2011), soulignant le lien entre effort reproductif intense, faible durée de vie et faible résistance aux ROS. Ces résultats pourraient donc être mis en lien avec un investissement énergétique fort dans les processus liés à la gamétogenèse au détriment des protections antioxydantes. Certains gènes tels que *sodmt* dans les deux organes ou *mxr* et *mt1* dans la glande digestive et les branchies, présentent aussi de très faibles niveaux d'ARN en septembre, alors que les pontes majeures de l'été sont déjà passées. Le coût énergétique de l'émission gamétique a déjà été décrit dans la littérature (Li et al., 2007; Li et al., 2009a, 2009b) et semble impacter négativement les activités enzymatiques antioxydantes, ce qui est cohérent avec les observations faites au niveau du transcriptome. Des expérimentations en laboratoire, ont par ailleurs montré qu'une exposition prolongée à un stress thermique légèrement supérieur aux moyennes saisonnières pouvait induire chez *C. gigas* des diminutions significatives d'expression en fin de cinétique (Meistertzheim et al., 2007). La période estivale à Arcachon est par ailleurs caractérisée par un pic de fréquentation touristique important, puisque la population locale peut être multipliée par 3 (Le Berre et al., 2010). L'augmentation des activités nautiques liées à ce phénomène sont donc susceptibles d'exercer une pression supplémentaire sur l'hydrosystème et sur des organismes déjà en situation de stress du fait de la gamétogenèse et des fortes températures estivales. Les moteurs des bateaux peuvent être à l'origine de rejets de HAPs, et les peintures des coques sont également impliquées dans le relargage de composés anti-salissures issus des peintures (chlorothalonile, dichlofluanide, cuivre...). Les effets en mélange de ces composés et leurs interactions avec les facteurs abiotiques et biotiques sont encore mal connus mais réels (Laskowski et al., 2010). La complexité du problème ne peut donc pas être résolue par une approche de terrain, et ces observations ne permettent pas de conclure sur les effets délétères du nautisme. On peut cependant supposer que les faibles niveaux transcriptomiques observés en été durant notre étude sont à la fois organe et gène dépendants, résultant des complexes interactions mentionnées précédemment.

Une observation intéressante peut être faite en mai 2009. Ce mois correspond à une période de gamétogenèse intense pour les huîtres, et coïncide avec des expressions élevées de *mt1* dans les branchies et de *mt1*, *mt2*, *cyp1a1* et *cox1* dans la glande digestive. Comme précisé plus haut, les MT présentent en général un pic lors de la reproduction ce qui est cohérent avec les hauts niveaux d'expressions observés ici. CYP1A1 fait partie d'une famille d'enzymes impliquée à la fois dans les processus de métabolisation de phase I mais aussi dans la synthèse d'éléments hormonaux potentiellement liés aux processus reproductifs (Rewitz et al., 2006). COXI enfin est impliqué dans la régulation du transfert électronique de la phosphorylation oxydative au niveau du complexe IV, ce qui lui confère un rôle central dans la gestion énergétique de la cellule importante en période de

gamétogenèse. La surexpression de ces gènes peut être une signature des mécanismes de la reproduction chez l'huître et devront être surveillés lors d'études *in-situ* ultérieures.

La période de l'automne-hiver 2009 – 2010 en revanche présente des caractéristiques différentes. De manière globale une augmentation des expressions géniques est observée pour atteindre des pics en décembre 2009, avec parfois des chutes successives en janvier 2010 comme c'est le cas pour *coxI*, *mt1* et *mt2* dans les glandes digestives. Farcy et collaborateurs (Farcy et al., 2007) ont observé le même type de tendance sans pouvoir en apporter la raison. De récents travaux concernant la saisonnalité des mécanismes antioxydants chez la moule ont avancé l'hypothèse d'un stress lié à la famine (Schmidt et al., 2013), ce qui est cohérent avec les faibles niveaux de chlorophylle a en janvier 2010. Une augmentation du taux de filtration en conséquence induirait une surproduction de ROS. De récentes études sur la dynamique des pesticides dans le Bassin d'Arcachon ont également supposé au regard des concentrations dans le milieu, que la résurgence de la nappe phréatique en hiver était liée à l'apport de pesticides épandus plus tôt dans l'année et stockés dans le sol et la nappe (Belles, 2012). De plus, les corrélations de Pearson de l'ACP indiquent un lien significatif entre la concentration en HAPs et les expressions de *gpx*, *sodmt* et *mxr*, ainsi qu'entre *mt2* et la concentration en cuivre dans les branchies. Les concentrations en HAPs dans la glande digestive sont également corrélées à *gpx*. Ces observations contribuent à justifier les forts niveaux d'expression hivernaux observés.

Ces résultats restent difficiles à interpréter à la lumière des observations faites dans le cadre de cette étude. Il est cependant important de garder à l'esprit que les expressions géniques relatives sont le reflet du niveau d'expression d'un gène, et ne sont pas obligatoirement à l'origine d'un niveau équivalent de protéine ou d'un haut niveau d'activité enzymatique, du fait notamment de régulations post-transcriptionnelles. Ce type de données peut être complété par l'étude d'activités enzymatiques par exemple, afin de mieux comprendre la saisonnalité des réponses antioxydantes de l'huître dans le Bassin d'Arcachon.

2.3.4. Les paramètres physico-chimiques du milieu

Les variations saisonnières de température présentent des variations cohérentes avec les saisons (maximum en été et minimum en hiver). De manière logique on observe ainsi des concentrations en oxygène plus faibles lorsque les températures sont hautes. Les différences de salinité entre la zone externe de la lagune et la zone orientale sont principalement dues à la distance par rapport aux apports d'eau douce de la Leyre. Les sites proches d'Eyrac sont donc bien sous une influence plus « continentale » que les sites proches de Bouée 13.

Les valeurs de MES retenues pour cette étude montrent par ailleurs des niveaux supérieurs à Bouée 13. Cela peut être mis en lien avec une remise en suspension supérieure du sédiment du fait d'un hydrodynamisme plus important (Plus et al., 2009). Inversement, La chlorophylle a, présente des valeurs légèrement supérieures au niveau d'Eyrac, ce qui peut être mis en lien avec l'influence continentale mentionnée précédemment (apports de nutriments supérieurs) favorable au développement phytoplanctonique (Glé et al., 2008). Un pic de production est néanmoins détecté en

janvier 2010 à Bouée 13, pouvant être associé à un phénomène de « bloom hivernal » spécifique du bassin d'Arcachon et déjà décrit dans la littérature (Glé et al., 2007).

2.3.5. Analyse statistique globale des données

L'ACP réalisée dans les branchies présente l'intérêt majeur de résumer l'information contenue dans le vaste jeu de données obtenu lors de cette étude. Son interprétation permet d'obtenir une vision globale du fonctionnement de l'hydrosystème mais n'est pas absolue, puisque dans le cas présent seuls 47,7% de la variabilité sont expliqués. Cela s'observe notamment par le fait que tous les individus et toutes les variables n'ont pas pu être conservés pour l'interprétation du fait d'une mauvaise représentation dans le plan factoriel.

Cette analyse multivariée permet pourtant d'isoler trois groupes d'individus dans l'espace, caractérisés par des valeurs fortes en diverses variables. Il s'avère que ces groupes correspondent à des périodes de l'année, mais ne discriminent pas les sites entre eux. Une certaine hétérogénéité au sein de chaque groupe permet cependant de nuancer l'interprétation et de retrouver les caractéristiques des différents sites.

Le groupe 1 tout d'abord, est constitué des individus au mois de mai 2009. Ces points sont isolés des autres en grande partie par des caractéristiques abiotiques, puisqu'ils présentent de fortes valeurs en pH et MES, mais aussi en IC. Ce début de cinétique se caractérise également par de faibles valeurs en Cu, Zn et HAPs comme en témoigne leur position dans l'espace, à l'opposé de ces variables. On constate de plus au sein du groupe, que les individus ayant les coordonnées les plus élevées sur l'axe 2 formé par les variables de bioaccumulation métallique, sont les stations de l'Ile aux oiseaux, du Tès et d'Eyrac comme les données l'ont montré précédemment.

Le groupe 2 regroupe les individus de l'été et de l'automne. Leur localisation dans l'espace est commandée principalement par de fortes valeurs de température (juillet surtout) et de concentrations en Cu et Zn (septembre et octobre). Ces individus sont en opposition avec la variable d'oxygène dissout dans l'eau, qui présente en effet des valeurs minimales en été avec les fortes températures. Ces individus, bien que regroupés sur l'axe 2, sont opposés sur l'axe 1, avec d'un côté les stations de juillet caractérisées par de fortes températures et des IC supérieurs, et de l'autre les stations de septembre et octobre présentant de plus fortes concentrations en MTs et HAPs. Les stations occidentales sont cependant mal représentées dans ce groupe.

Le groupe 3 finalement regroupe les stations étudiées en décembre 2009 et en janvier 2010. Cet ensemble d'individus se caractérise principalement par des longueurs de coquilles élevées, notamment puisque les huîtres avaient grandi en fin de cinétique, et par des concentrations en oxygène dissout importantes ce qui est cohérent avec la période hivernale. C'est également durant cette période que les gènes les mieux représentés s'expriment comme en témoigne la projection de *gpx*, *mrx*, *sod*, *gst* et *sodmt*. Cette période semble se caractériser également par des concentrations en MTs et en HAP importantes, ce qui coïncide en effet avec les observations réalisées précédemment. Il en va de même pour la saisonnalité des expressions géniques dont le maximum semblait apparaître en hiver.

L'ACP réalisée dans la glande digestive est très similaire à celle réalisée pour les branchies. Elle complète cependant bien cette dernière dans la mesure où les individus de la période estivale et automnale sont mieux représentés. On y observe encore une opposition sur l'axe du mois de juillet, caractérisé par de fortes températures, de forts IC et des salinités élevées, aux sites orientaux du Tès et de Eyrac en septembre et en octobre, définis par des valeurs faibles d'IC, mais supérieurs en concentrations de HAPs, Cu et Zn.

La projection des variables dans la glande digestive, souligne l'expression hivernale de certains gènes tels que *sodmt* et *gpx*, mais insiste également sur les hauts niveaux d'expressions détectés en mai 2009 pour *mt1* et *cyp1a1*, en lien avec les processus reproductifs. Dans cet organe aussi, les groupes ont principalement été séparés par les différentes périodes de l'année. Au sein de chaque groupe cependant, on peut retrouver les différences entre stations mentionnées plus haut, puisque les stations du Tès, d'Eyrac et de l'Ile aux oiseaux, présentent presque toujours les coordonnées les plus élevées sur l'axe 2, construit essentiellement à partir des variables Cu, Zn, HAP et MTs.

Par ailleurs, l'étroite corrélation entre la production de MTs et la contamination par les métaux et les HAPs est clairement mise en évidence comme leurs projections sur le plan factoriel le montrent.

2.4. Conclusion

L'étude menée lors de cette année de suivi *in-situ* a permis de mettre en évidence à la fois une saisonnalité des paramètres étudiés et une hétérogénéité spatiale au sein de la lagune. En dépit du fait que les six stations choisies soient dans les eaux néritiques externes, la proximité des agglomérations du bassin, des rejets de la Leyre et le brassage inférieur des eaux ont induit une contamination supérieure des organismes au niveau de l'Ile aux oiseaux, du Tès et de Eyrac en HAPs, Zn, Cd et Cu (particulièrement le Tès). Les voies de contaminations suspectées impliquent à la fois la voie dissoute comme la voie trophique. Associée à cette contamination chimique supérieure, les sites les plus orientaux de la lagune ont également montré une croissance inférieure en dépit d'apports nutritifs équivalents, soulignant l'impact de la qualité de l'eau sur le rendement ostréicole.

De manière surprenante, les MTs n'ont présenté aucune saisonnalité en lien avec les processus de reproduction. Une corrélation forte a cependant été mise en évidence entre cette variable et la contamination chimique des huîtres, confirmant la pertinence des MTs comme biomarqueur de la contamination du milieu et le stress oxydant induit par ces polluants.

La gamétogenèse semble cependant induire une saisonnalité au niveau des paramètres génétiques. Une des difficultés est donc de discriminer les conséquences biologiques de ces processus, des effets d'une contamination estivale en lien avec les activités nautiques. Une autre question concerne les niveaux transcriptomiques élevés détectés durant la période de l'automne – hiver. Des études supplémentaires sur cette période en particulier permettraient de mieux comprendre les facteurs abiotiques ou biotiques à l'origine de ces fortes expressions géniques relatives.

3. OSQUAR : Bilan de deux années de suivi (2010 – 2012)

3.1. Introduction

Le projet région Aquitaine **OSQUAR** (Ostréiculture et Qualité du milieu : approche intégrée du bassin d'Arcachon) est la poursuite des études menées lors du projet ASCOBAR. Deux opérations de transplantation sur le terrain ont été réalisées, et seront présentées dans les paragraphes suivants. Les détails de la mise en place du suivi sont détaillés dans la partie méthodologie. Les mêmes biomarqueurs ont été étudiés, à une fréquence cependant plus espacée (saisonnière). On notera tout de même que les données de taux lipidiques et de carbone organique ont été exploitées et sont présentées ici. Le chapitre suivant s'attardera donc à présenter et à confronter les résultats obtenus durant ces deux opérations de « caging », ainsi qu'à les comparer à ceux obtenus durant la deuxième année du programme ASCOBAR.

NB : Les sites de Grand Banc et Arguin présentent des lacunes dans les données dues aux aléas du terrain. Des actes de vandalisme au niveau des stations d'Eyrac et le Tès ont également empêché l'acquisition des données en fin de cinétique sur l'année 2012.

3.2. Résultats

3.2.1. La croissance

Les données de croissance sont représentées par des moyennes \pm écarts-types ($n=5$). Des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis suivis de tests post hoc de Conover Iman ont été réalisés pour : (1) déterminer les différences entre stations (lettres majuscules) et (2) déterminer l'effet du « temps » au niveau de chaque site (lettres minuscules).

L'évolution des **masses fraîches** des organismes (sans coquille) sont présentées dans la Figure 56. De manière globale, on observe au niveau des deux années de suivi qu'Arguin présente les croissances de corps mou les plus importantes, puisque les valeurs en fin de cinétique atteignent $8,8 \pm 1,5$ g en fin d'année 1 et $16,6 \pm 3,9$ g en fin d'année 2 contre environ 4 et 3 g en juillet 2010 et juillet 2011. Les différences entre stations sont nuancées sur la première année de suivi, puisque l'Ile aux oiseaux présente des niveaux équivalents à Arguin, suivi d'Eyrac, Grand Banc, Bélisaire et Le Tès. Lors de la deuxième année, tous les sites présentent des niveaux très bas en comparaison d'Arguin.

Au niveau saisonnier, aucune évolution n'est observable à Grand Banc et Le Tès lors des deux années. Les stations présentent les croissances les plus notables après Arguin sont Eyrac lors de l'année 1 ($5,4 \pm 1,2$ g), Bélisaire et Ile aux oiseaux lors de l'année 2 (Bé : $7,2 \pm 0,9$ g ; Io : $7,4 \pm 2,5$ g).

Des constats similaires peuvent être réalisés concernant les **longueurs de coquilles** (Figure 57). La station d'Arguin présente encore les valeurs maximales qui la distinguent des autres de manière générale (année 1 : $10,2 \pm 0,3$ cm ; année 2 : $11,7 \pm 1,9$ cm). La croissance de coquille la plus faible est constatée à Le Tès pour l'année 1 avec un maximum de $7,6 \pm 0,9$ cm et à Eyrac pour l'année 2

avec un maximum de $7,9 \pm 0,6$ cm. Les stations Bélisaire, Grand Banc et Ile aux oiseaux présentent des niveaux moyens intermédiaires ou équivalents.

Au niveau saisonnier, aucune augmentation significative n'est observable à Grand Banc lors des deux années, ni à Ile aux oiseaux lors de l'année 1 ou à Le Tès lors de l'année 2. Bélisaire et Eyrac présentent des croissances significatives lors des deux années (Bé : (1) $7,7 \pm 0,5$ cm et (2) $9,8 \pm 0,7$ cm ; Ey : (1) $8,3 \pm 0,4$ cm et (2) $7,9 \pm 0,6$ cm).

Les **indices de conditions** présentent des niveaux légèrement supérieurs lors de la première année de suivi par rapport à la seconde. La Figure 58 présente les valeurs moyennes obtenues. Les tendances globales diffèrent d'une année sur l'autre : aucune différence entre stations n'existe lors de la première année, hormis entre Bélisaire et Eyrac ; lors de la deuxième année toutes les stations présentent un niveau équivalent, mais systématiquement inférieur à Arguin.

Au niveau saisonnier, des chutes de valeurs sont observables entre le début estival de la cinétique et l'hiver suivant. Ces chutes sont significatives pour Le Tès et Eyrac la première année (Lt : de 22 ± 4 à 15 ± 6 ; Ey : de 25 ± 2 à 19 ± 4) et pour Bélisaire, Le Tès et Eyrac la deuxième année (Bé : de 22 ± 4 à 13 ± 2 ; Lt : de 16 ± 2 à 10 ± 2 ; Ey : de 17 ± 4 à 11 ± 2). La seconde année de suivi présente des nouvelles augmentations des valeurs lors du réchauffement printanier notamment à Le Tès en mai 2012 (15 ± 5).

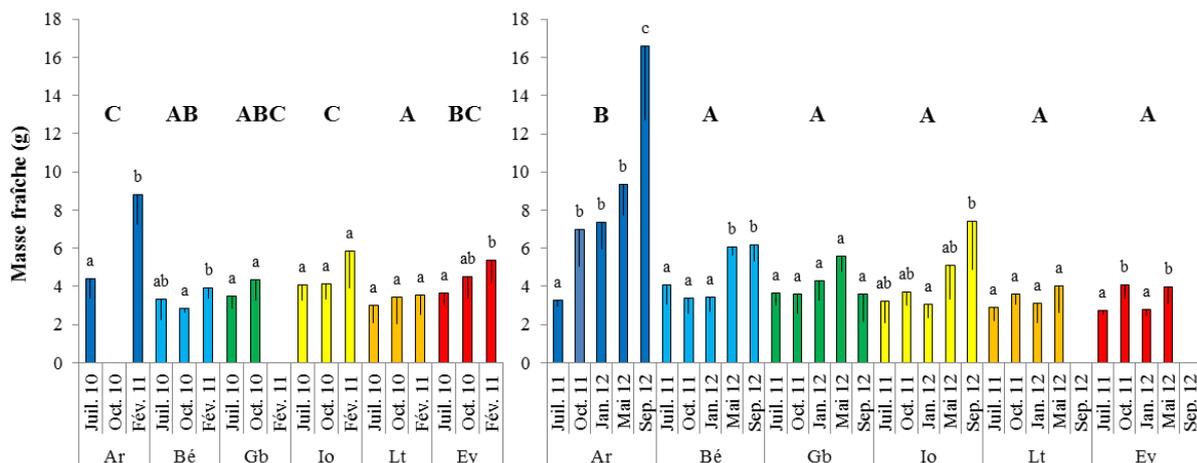


Figure 56 : Evolution de la masse des corps mous des huîtres cultivées durant les deux années de suivi OSQUAR

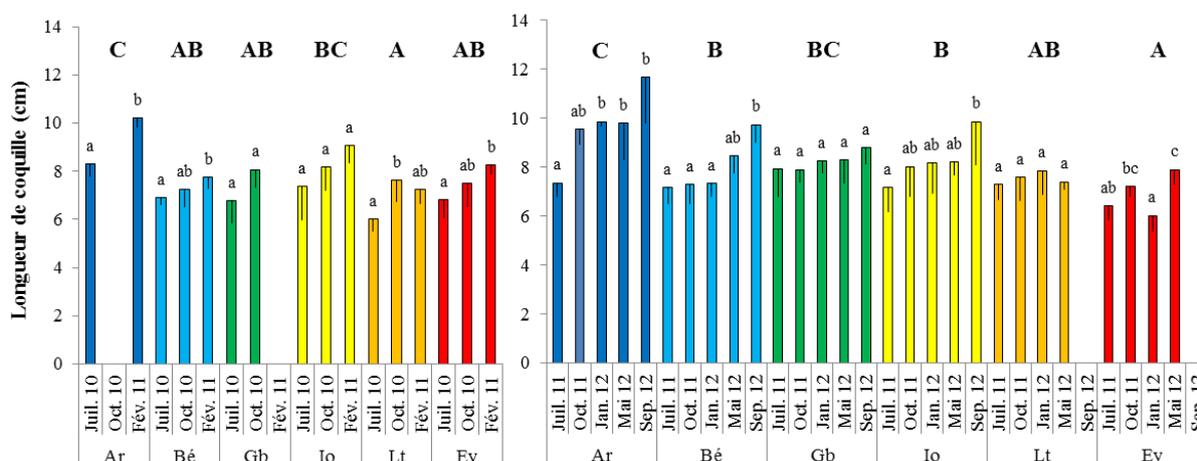


Figure 57 : Evolution de la longueur des coquilles des huîtres cultivées durant les deux années de suivi OSQUAR

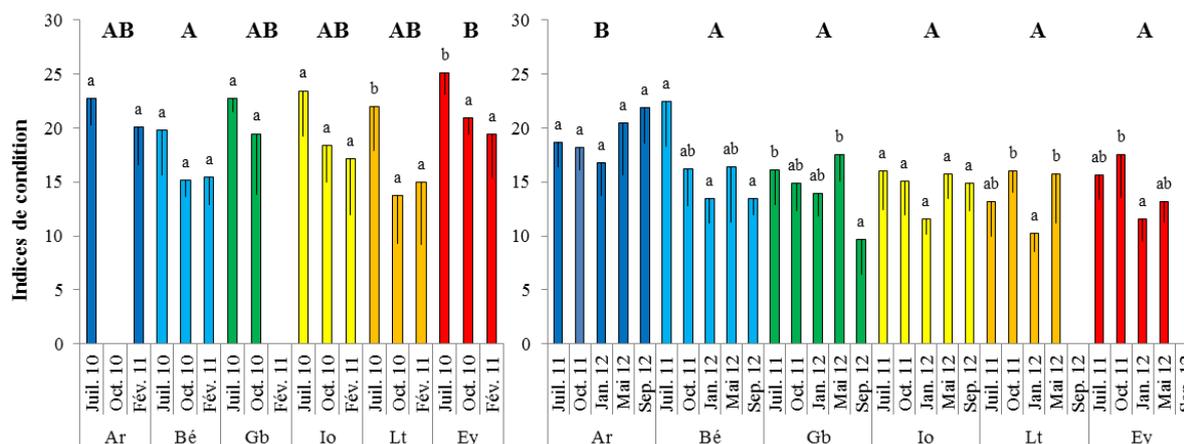


Figure 58 : Evolution indices de condition des huîtres cultivées durant les deux années de suivi OSQUAR

3.2.2. La bioaccumulation métallique

Les données de bioaccumulation en Cu, Zn et Cd ont été traitées de la même manière que les données de croissance (tests non paramétriques de Kruskal-Wallis puis post hoc de Conover Iman ; $p < 0,05$). Les valeurs affichées dans les figures suivantes sont les moyennes \pm erreur standard basées sur 5 individus. Comme précédemment, les graphes de gauche concernent l'année 1 du suivi, et les graphes de droite concernent l'année 2.

3.2.2.1. Le cuivre

Les résultats de concentrations en Cu dans les branchies, la glande digestive et les restes du corps, pour les deux années de suivi terrain sont présentés Figure 59. Les **tendances globales** sont communes aux trois organes et aux deux années de suivi : les stations Eyrac, Le Tès et Ile aux oiseaux présentent les bioaccumulations les plus élevées. Arguin à l'inverse présente systématiquement les niveaux les plus bas, tandis que Bélisaire et Grand Banc présentent des niveaux intermédiaires entre Arguin et les stations les plus orientales. Les concentrations les plus élevées sont observées dans les branchies, puis dans la glande digestive, et enfin dans les restes du corps.

Peu de **variations saisonnières** significatives sont observables pour ce métal. Dans les branchies, deux chutes significatives sont observables en février 2011 pour Arguin et Bélisaire (Ar : 115 ± 16 $\mu\text{g/g}$, ps ; Bé : 170 ± 10 $\mu\text{g/g}$, ps). Un pic de concentration est également observable à Grand Banc en septembre 2012, commun aux deux autres organes (Br : 591 ± 171 $\mu\text{g/g}$, ps ; Gd : 352 ± 112 $\mu\text{g/g}$, ps ; R : 185 ± 28 $\mu\text{g/g}$, ps). La glande digestive présente des variations communes avec les branchies, avec en plus une chute des concentrations à Eyrac en octobre 2010 (157 ± 23 $\mu\text{g/g}$, ps). Les restes du corps en revanche se distinguent des deux autres organes par des hausses significatives de concentrations en octobre 2010 pour Bélisaire, Le Tès (Bé : 201 ± 28 $\mu\text{g/g}$, ps ; Lt : 256 ± 28 $\mu\text{g/g}$, ps), en janvier 2012 pour Arguin et Grand Banc (81 ± 10 $\mu\text{g/g}$, ps ; Gb : 173 ± 31 $\mu\text{g/g}$, ps) et en septembre 2012 pour Bélisaire (174 ± 13 $\mu\text{g/g}$, ps).

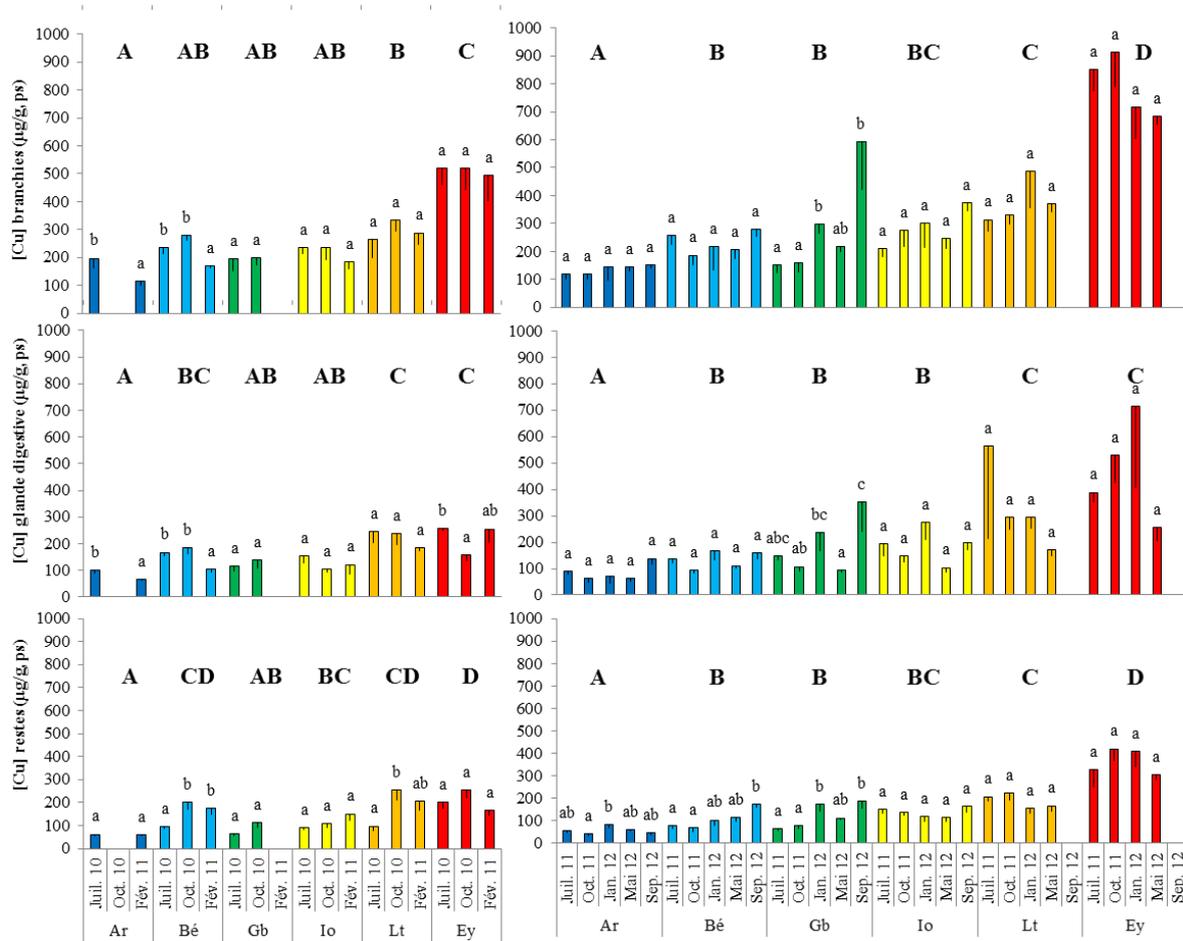


Figure 59 : Evolution des concentrations en cuivre dans les branchies, la glande digestive et les restes du corps des huîtres cultivées des deux années de suivi terrain OSQUAR

3.2.2.2. Le zinc

La Figure 60 présente les concentrations en Zn dans les trois organes d'intérêt lors des deux années de suivi du programme OSQUAR. Les **tendances générales** présentent certains points communs d'une année sur l'autre : dans les branchies, aucune différence entre stations n'est observable lors de la première année tandis que les stations Le Tès et Grand Banc présentent des niveaux supérieurs lors de la seconde année. Dans la glande digestive et le reste du corps mou, les stations Bélisaire, Le Tès et Eyrac présentent les niveaux les plus élevés lors de la première année de suivi. Ces deux organes sont aussi caractérisés lors de la seconde année de suivi par des valeurs élevées à Le Tès, ainsi qu'à Grand Banc, Ile aux oiseaux et Eyrac pour les restes du corps. De manière générale, les deux années et les trois organes sont caractérisés par des niveaux systématiquement minimaux à Arguin.

Les **variations saisonnières** sont également rares à l'instar du cuivre. Durant la première année de suivi, des chutes de concentrations sont observées : (1) dans les branchies à Eyrac en février 2011 ($3055 \pm 205 \mu\text{g/g, ps}$) ; (2) dans la glande digestive à Ile aux oiseaux et Eyrac en octobre 2010 (Io : $990 \pm 128 \mu\text{g/g, ps}$; Ey : $1249 \pm 128 \mu\text{g/g, ps}$). De fortes hausses à l'inverse sont notées dans les restes à Bélisaire en février 2011 ($2900 \pm 314 \mu\text{g/g, ps}$) et à Le Tès en octobre 2010 ($2359 \pm 349 \mu\text{g/g, ps}$). Durant la deuxième année de suivi, on observe un pic important de concentration dans les trois organes à Grand Banc en septembre 2012 (Br : $9027 \pm 2890 \mu\text{g/g, ps}$; Gd : $5037 \pm 1727 \mu\text{g/g, ps}$; R :

2579 ± 416 µg/g, ps). On peut également observer une forte hausse des concentrations à Bélisaire en mai et septembre 2012 dans les restes du corps (mai : 1733 ± 261 µg/g, ps ; septembre : 1902 ± 95 µg/g, ps) et une forte chute à Ey en janvier 2012 dans les branchies (2463 ± 607 µg/g, ps).

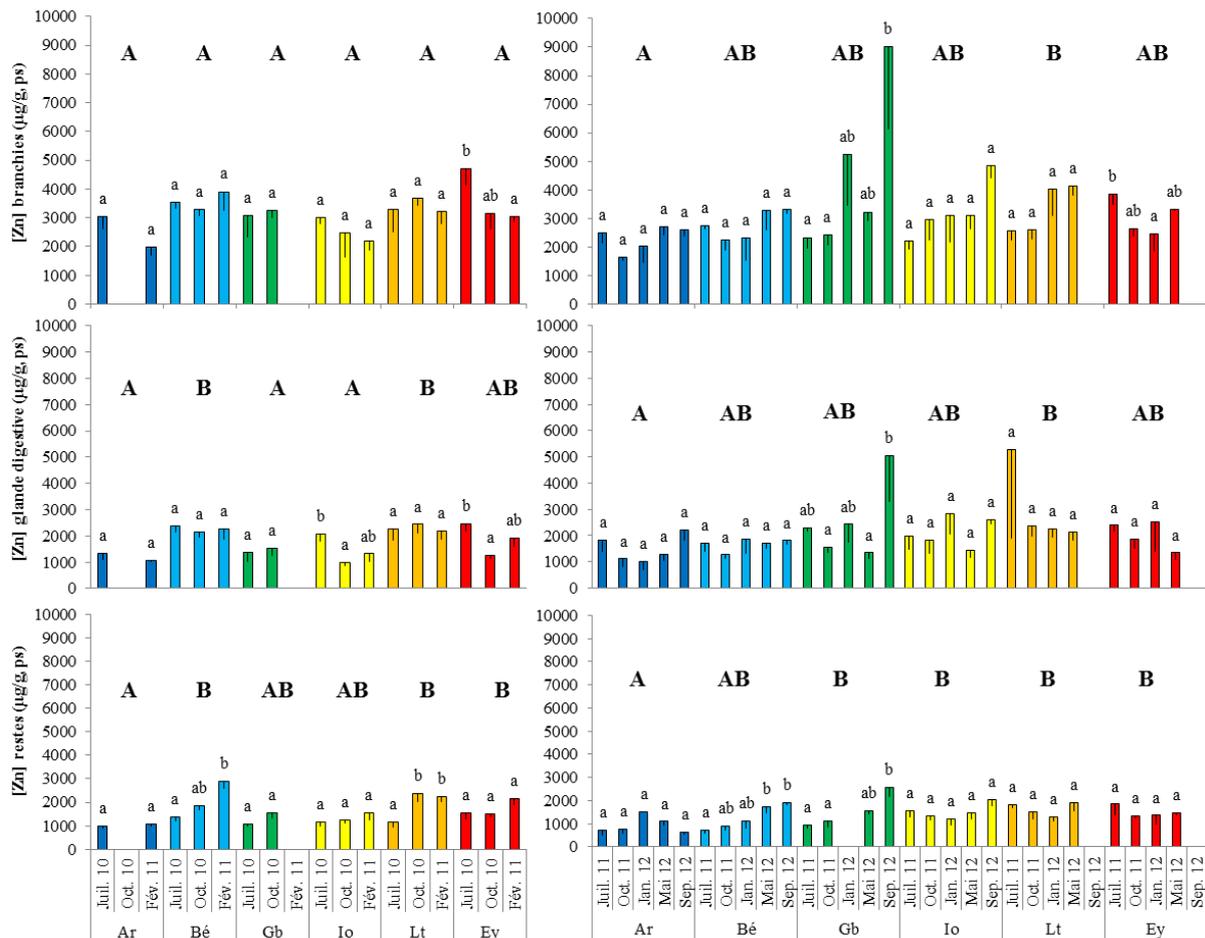


Figure 60 : Evolution des concentrations en zinc dans les branchies, la glande digestive et les restes du corps des huîtres cultivées des deux années de suivi terrain OSQUAR

3.2.2.3. Le cadmium

Les résultats concernant le Cd sont présentés Figure 61. Les concentrations les plus élevées sont atteintes dans la glande digestive et les branchies. Les **différences entre stations** présentent des points communs entre les observations de la première et de la deuxième année de suivi, mais sont plus nuancées lors de la deuxième année. Durant la première année, ces différences n'apparaissent que dans la glande digestive, avec les trois stations les plus occidentales Ar, Bé et Gb qui présentent des valeurs significativement supérieures à celles observées à Io, Lt et Ey. Cette tendance se retrouve lors de la seconde année de suivi dans la glande digestive et dans une moindre mesure dans les branchies et les restes du corps qui sont principalement dominés par les fortes concentrations observées à Gb.

En termes de **variations saisonnières**, des chutes de concentration sont presque toujours observées entre le début estival de la cinétique et la saison suivante pour les deux années de suivi. Ces chutes sont significatives seulement durant la première année dans les branchies à Bélisaire, Le Tès, Eyrac en octobre 2010 (Bé : 2,2 ± 0,1 µg/g, ps ; Lt : 1,2 ± 0,1 µg/g, ps ; Ey : 1,4 ± 0,1 µg/g, ps), dans la glande digestive à Arguin, Le Tès, Eyrac en octobre 2010 ou février 2011 (Ar : 2,8 ± 0,3 µg/g, ps ; Lt : 1,6 ± 0,1 µg/g, ps ; Ey : 1,4 ± 0,1 µg/g, ps) et durant la deuxième année dans la glande digestive à Arguin en

octobre 2011 ($2,5 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$, ps). Les restes du corps sont le seul organe durant l'année 1 à présenter des augmentations significatives comme observé à Grand Banc et Le Tès.

On constate néanmoins que la deuxième année de suivi, plus longue, se caractérise par une reprise de la contamination sur la fin de la cinétique. Ce phénomène apparaît dès mai 2012 dans les branchies à Arguin, Bélisaire, Ile aux oiseaux, Le Tès, Eyrac (Ar : $4,1 \pm 0,5 \mu\text{g/g}$, ps ; Bé : $5,1 \pm 0,6 \mu\text{g/g}$, ps ; Io : $2,9 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$, ps ; Lt : $4,9 \pm 0,7$; Ey : $4,5 \pm 0,8 \mu\text{g/g}$, ps) et janvier 2012 pour Grand Banc ($4,4 \pm 1,2 \mu\text{g/g}$, ps). Il en va de même dans la glande digestive pour Arguin, Bélisaire, Le Tès, Eyrac en mai 2012 (Ar : $5,8 \pm 0,9 \mu\text{g/g}$, ps ; Bé : $5,7 \pm 0,5 \mu\text{g/g}$, ps ; Lt : $3,3 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$, ps ; Ey : $3,2 \pm 0,2 \mu\text{g/g}$, ps) et Grand Banc, Ile aux oiseaux en septembre 2012 (Gb : $12,1 \pm 3,1 \mu\text{g/g}$, ps ; Io : $4,9 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$, ps). Cette observation est également faite dans une moindre mesure dans les restes du corps, et seulement pour les stations Arguin, Bélisaire et Grand Banc.

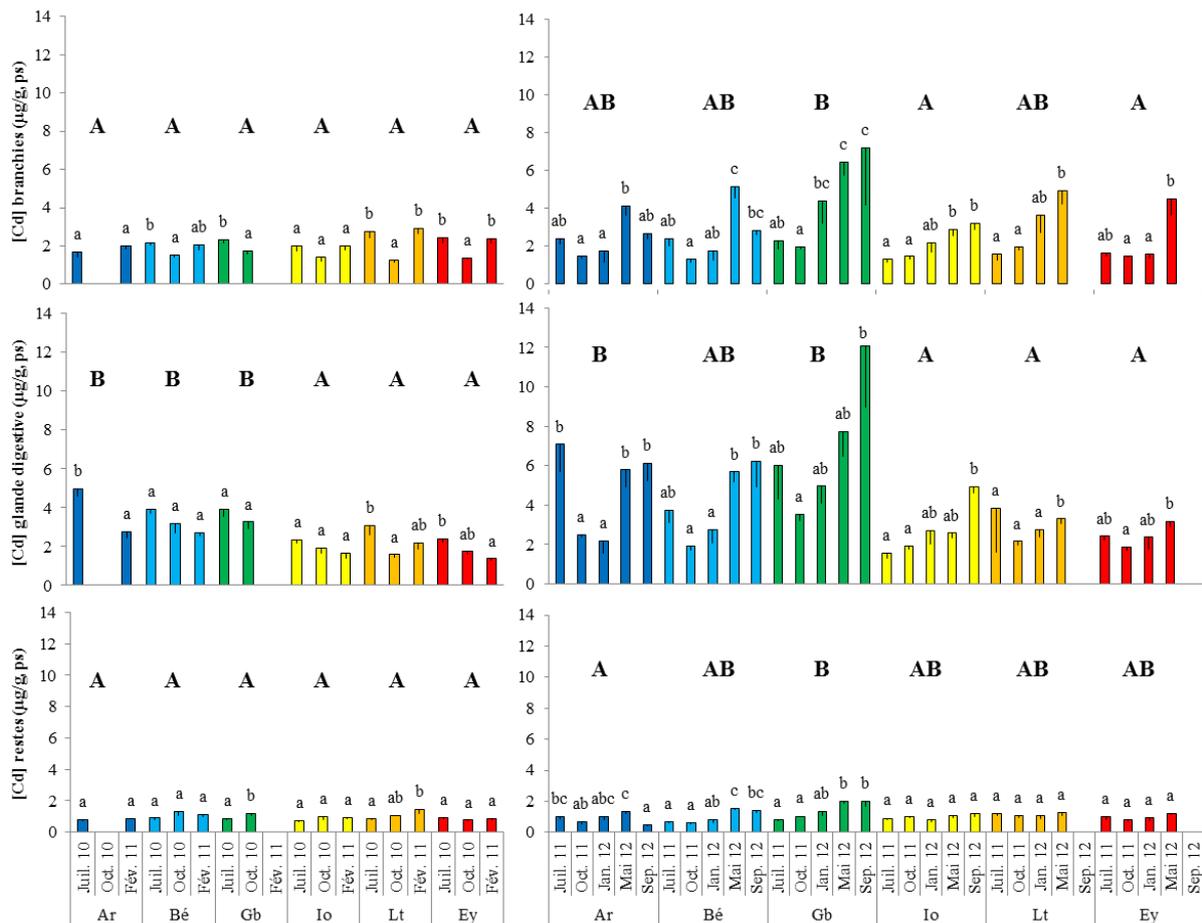


Figure 61 : Evolution des concentrations en cadmium dans les branchies, la glande digestive et les restes du corps des huîtres cultivées des deux années de suivi terrain OSQUAR

3.2.3. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs)

3.2.3.1. Dans les huîtres cultivées

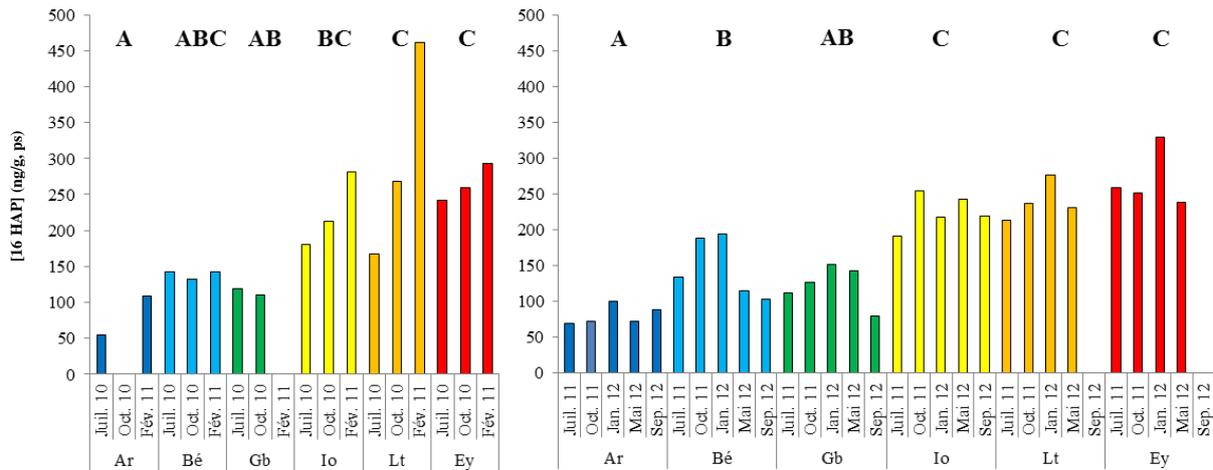


Figure 62 : Evolution des concentrations en HAPs dans les huîtres cultivées des deux années de suivi terrain OSQUAR

Les concentrations en HAPs mesurées dans les huîtres transplantées sur le terrain sont présentées Figure 62. Les différences entre stations ont été mises en évidence (lettres majuscules) grâce à des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis suivis de tests post-hoc de Conover-Iman ($p < 0,05$).

Comme l'indique la Figure 62, ces différences se retrouvent d'une année à l'autre. Les sites d'Ile aux oiseaux, Le Tès et Eyrac sont les plus contaminés, suivis de Bélisaire, Grand Banc et enfin d'Arguin qui se présente encore comme le site le plus « propre ». Les concentrations atteintes sont du même ordre de grandeur entre les deux années de suivi, pouvant atteindre 462 ng/g, ps à Le Tès en février 2011, 329 ng/g, ps à Eyrac en janvier 2012. A l'inverse, les valeurs maximales obtenues à Arguin sont de 108 ng/g, ps en février 2011 et seulement de 100 ng/g, ps en janvier 2012. Les variations saisonnières indiquent globalement une augmentation des concentrations dans le temps durant l'année 1, notamment à Ile aux oiseaux et Le Tès. Des chutes sont cependant observables durant la deuxième année de suivi en fin de cinétique au niveau des stations Bélisaire et Grand Banc.

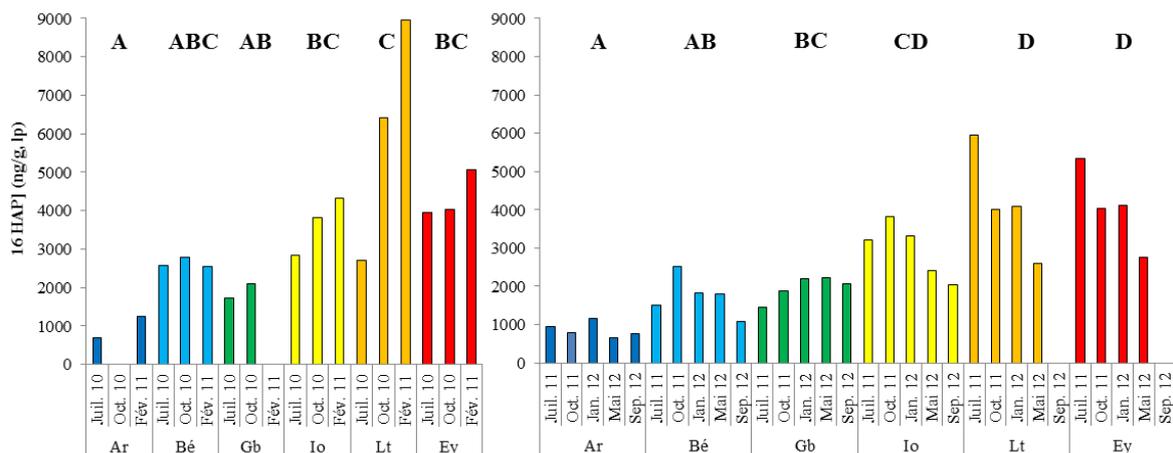


Figure 63 : Evolution des concentrations en HAPs normalisées par les taux de lipides dans les huîtres cultivées des deux années de suivi terrain OSQUAR

Ces concentrations une fois normalisées par les taux de lipides (Figure 63), présentent les mêmes tendances inter-stations. Une évolution saisonnière transparait tout de même lors de la deuxième année de suivi, puisque des diminutions dans le temps apparaissent au niveau de presque toutes les stations, principalement Le Tès et Eyrac.

3.2.3.2. Dans les sédiments

Les concentrations en HAPs dans les sédiments ont été traitées de la même manière que celles dans les huîtres (Figure 64). Une forte hétérogénéité est observable entre les différents sites, mais les stations Arguin, Grand Banc et Eyrac sont celles qui présentent systématiquement les concentrations les plus faibles lors des deux années de suivi. Le site Bélisaire est celui à l'inverse présentant les concentrations les plus élevées de manière globale, pouvant aller jusqu'à 2517 ng/g, ps en janvier 2012. Les sédiments de Le Tès montrent également de fortes valeurs, notamment en février 2011 avec 5279 ng/g, ps. Aucune tendance saisonnière ne semble apparaître. On constate également une large amplitude dans les concentrations mesurées, pouvant aller de 1 à 2 ng/g, ps comme observé à Eyrac et Arguin jusqu'à plusieurs milliers de ng/g, ps comme cité précédemment.

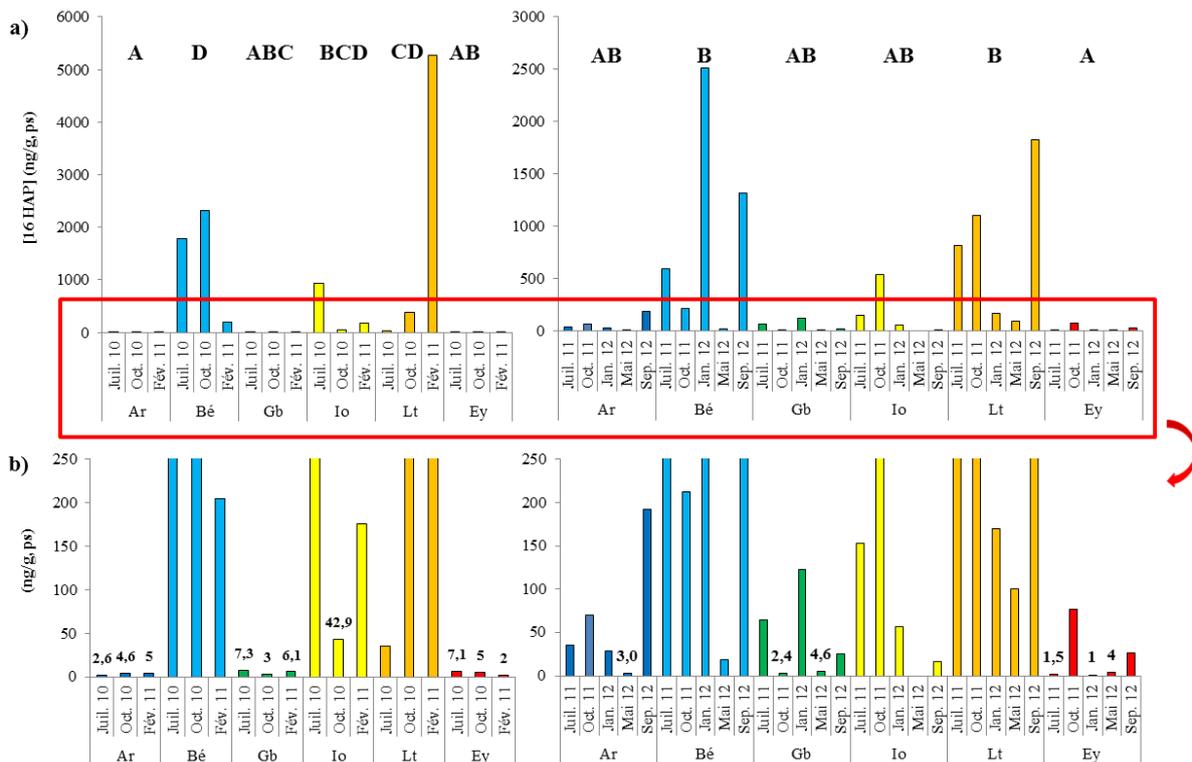


Figure 64 : Evolution des concentrations en HAPs dans les sédiments prélevés lors des deux années de suivi terrain OSQUAR (a) et zoom sur les valeurs basses (b).

Les teneurs en carbone organique total (Total Organic Carbon ou TOC) ont également été mesurées et présentent une corrélation statistiquement significative avec les concentrations en HAPs totaux dans les sédiments comme le montre la Figure 65. Trois tests de corrélation (Spearman, Pearson et Kendall) ont été réalisés et présentent systématiquement des p valeurs inférieures à 0,0001.

On observe notamment de manière empirique que les concentrations en HAPs sont très faibles voire nulles pour des teneurs en TOC inférieures à 0,2%, hormis pour quelques points. Le lien entre

concentration en HAPs et TOC a déjà été montré dans la littérature (Boitsov et al., 2009) notamment dans l'écosystème bassin d'Arcachon (Crespo, 2009).

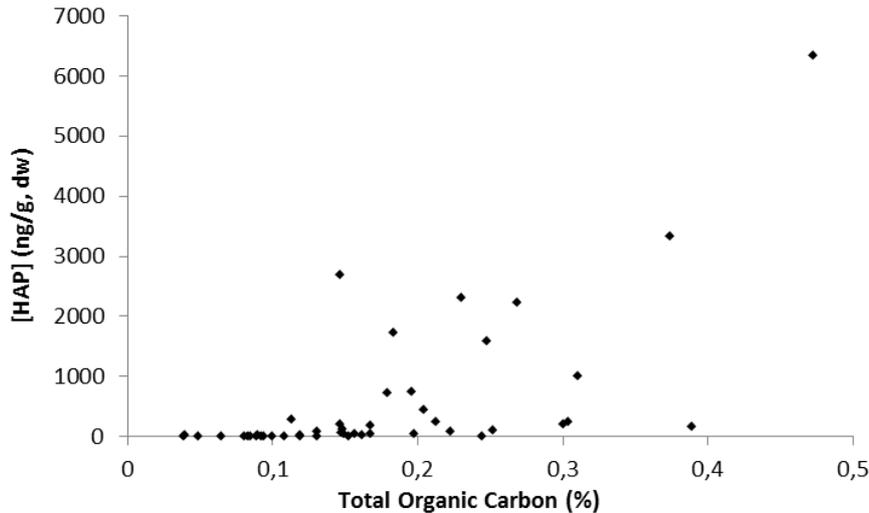


Figure 65 : Corrélation entre les concentrations en HAPs totaux dans les sédiments et les teneurs en carbone organique total (OSQUAR).

3.2.3.3. Empreinte moléculaire des échantillons analysés

Les résultats exposés précédemment concernent uniquement les 16 HAPs déclarés prioritaires par l'US EPA. Les analyses réalisées ont cependant permis de quantifier plus d'une vingtaine de composés différents, dont les proportions relatives varient d'une matrice à l'autre. La Figure 66 présente ces proportions pour les 22 composés majoritaires dosés dans les échantillons d'huîtres cultivées (à gauche) et de sédiments (à droite). Les composés les plus légers sont à gauche des graphiques et les plus lourds à droite. Les valeurs présentées correspondent aux proportions relatives calculées pour chaque composé moyennées sur tout le suivi *in situ* OSQUAR et au niveau de chaque site. Les moyennes sont donc présentées pour $n = 8$ pour les huîtres et les sédiments ; les barres d'erreurs correspondent aux erreurs standards.

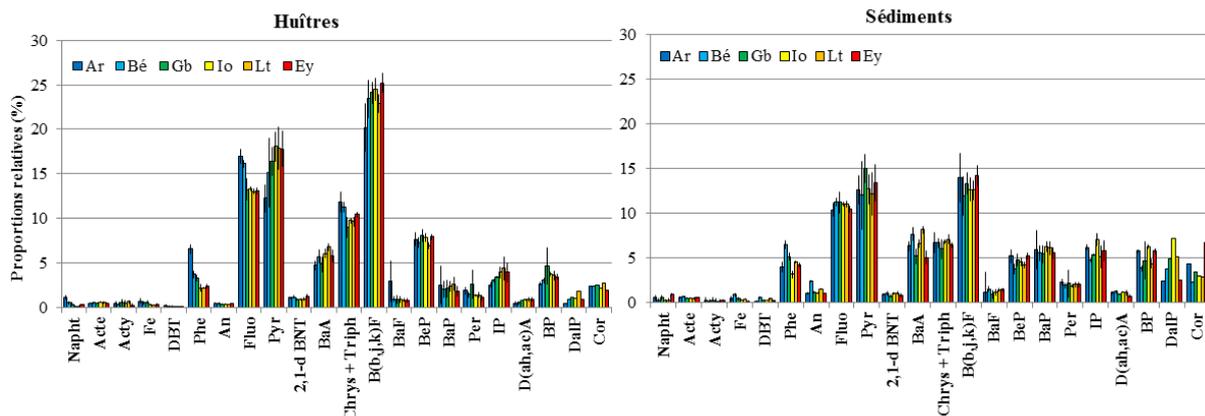


Figure 66 : Proportions relatives des HAPs majoritaire calculées au niveau de chaque site pour les matrices biologiques et sédimentaires.

Dans les huîtres, les composés de masse intermédiaire tels que les isomères benzo(b,k,j)fluoranthène, le fluoranthène et le pyrène sont largement majoritaires (entre 10% et 25%) en comparaison aux composés de faible et haut poids moléculaire. Un constat similaire peut-être réalisés dans les

sédiments, avec tout de même une proportion inférieure en composés de masses intermédiaires au profit des HAPs les plus lourds tels que l'indéno(1,2,3-cd)pyrène, le benzo(a)pyrène, le benzo(e)pyrène ou le benzo(g,h,i)pérylène qui représentent au moins 5% des HAPs totaux mesurés. Le dibenzo(al)pyrène et le coronène sont également plus représentés dans les matrices sédimentaires que biologiques.

3.2.4. La synthèse de métallothionéines

Les données présentées ici ne concernent que l'année 1 du suivi terrain OSQUAR. Des aléas concernant la conservation des échantillons de la seconde année n'ont pas permis d'obtenir des résultats fiables. Les méthodes statistiques présentées précédemment ont été employées pour le traitement des données (Kruskal-Wallis) et les graphiques ont été réalisés de la même manière que pour les autres paramètres (moyenne \pm écart-type, $n=5$).

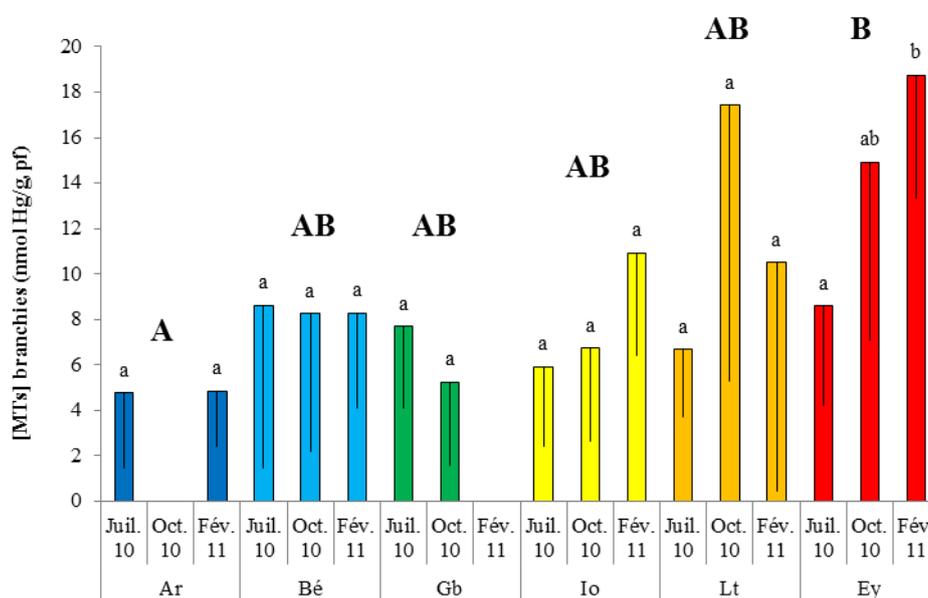


Figure 67 : Evolution des concentrations en métallothionéines dans les branchies des huîtres prélevées lors de la première année de suivi du programme OSQUAR

La Figure 67 présente les concentrations en MTs mesurées dans les **branchies**. Aucune variation significative n'apparaît entre les stations étudiées, hormis entre Arguin et Eyrac qui présentent respectivement les niveaux les plus faibles et les plus élevés obtenus durant cette année d'étude. La forte variabilité interindividuelle de ce biomarqueur n'a pas permis de détecter de variations saisonnières significatives, sauf à Eyrac qui présente une augmentation dans le temps entre juillet 2010 ($8,6 \pm 4,3$ nmol Hg/g, pf) et février 2011 ($18,7 \pm 5,4$ nmol Hg/g, pf).

Un constat similaire peut être fait dans la **glande digestive** (Figure 68), puisque les deux seules stations présentant une différence significative sont Ile aux oiseaux et Eyrac avec respectivement les niveaux les plus faibles et les plus élevés mesurés durant cette année de suivi. Au niveau saisonnier, seules deux chutes marquées sont observées à Arguin (de $44,2 \pm 7,7$ nmol Hg/g, pf à $35,7 \pm 3,8$ nmol Hg/g, pf) et à Grand Banc ($49,3 \pm 8,6$ nmol Hg/g, pf à $39,6 \pm 7,5$ nmol Hg/g, pf).

Les **restes du corps** finalement, ne présentent aucune tendance inter-station significative, ni aucune variation cinétiques suffisantes pour détecter une saisonnalité du paramètre (Figure 69).

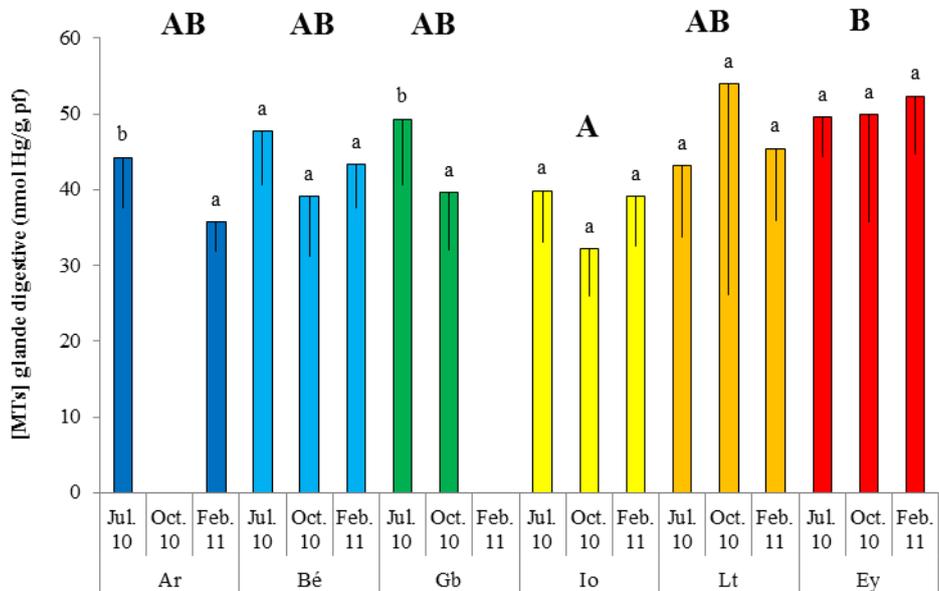


Figure 68 : Evolution des concentrations en métallothionéines dans les glandes digestives des huîtres prélevées lors de la première année de suivi du programme OSQUAR

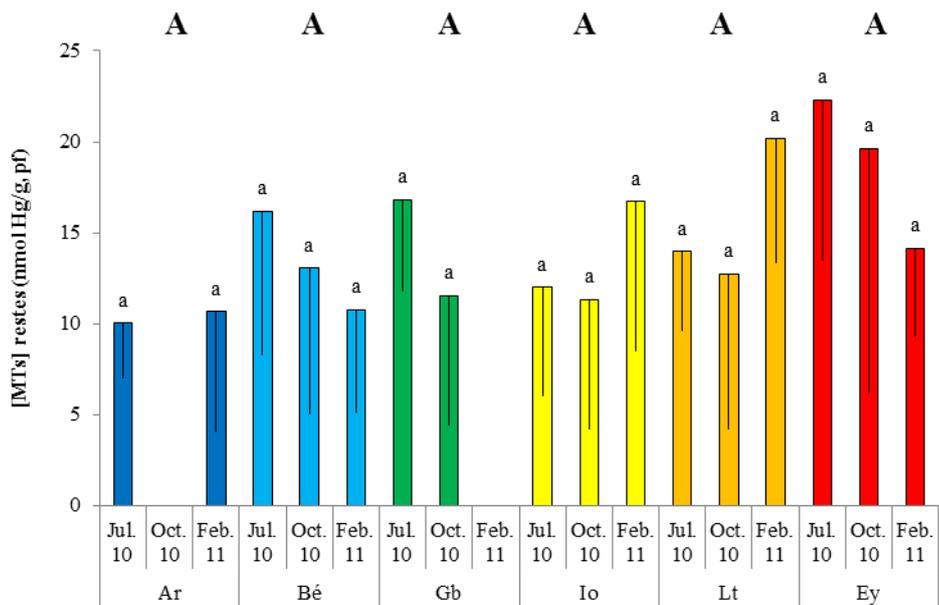


Figure 69 : Evolution des concentrations en métallothionéines dans les restes du corps mou des huîtres prélevées lors de la première année de suivi du programme OSQUAR

3.2.5. Les expressions géniques relatives

3.2.5.1. Année 1

La Figure 70 présente les variations d'expressions géniques relatives pour les 10 gènes de stress (moyenne \pm erreur standard) étudiés durant la première année de suivi. Les données ont été traitées de la même manière que pour les autres paramètres (Kruskal-Wallis suivi de Conover-Iman), à la différence que ce sont les différences entre les différents temps de prélèvements qui ont été mises en évidence (majuscules), puis les différences entre sites au niveau de chaque point cinétique (minuscules).

Concernant les **variations saisonnières** dans les **branchies**, on constate que les gènes *gst*, *cat*, *coxI*, *mt1* et *sodmt* atteignent des niveaux significativement supérieurs en hiver durant février 2011. Le gène *cyp1a1* en revanche indique un niveau de transcription maximal en été durant juillet 2010. Les gènes *gpx*, *mxr*, *sod*, et *mt2* ne présentent pas d'évolution significative dans le temps.

En **juillet 2010**, les stations Bélisaire et Grand Banc présentent les niveaux d'expression les plus élevés pour les gènes *mxr* (Bé : $0,11 \pm 0,07$; Gb : $0,25 \pm 0,14$), *cat* (Bé : $0,09 \pm 0,05$; Gb : $0,24 \pm 0,12$), *mt2* (Bé : $1,93 \pm 0,40$) et *sodmt* ($0,26 \pm 0,14$; Gb : $0,17 \pm 0,05$). Arguin présente également des niveaux élevés durant cette période pour *mxr* ($0,012 \pm 0,005$) et *cat* ($0,022 \pm 0,012$).

La station Ile aux oiseaux se démarque des autres en **octobre 2010** avec des niveaux significativement supérieurs atteints pour les gènes *gpx* ($0,39 \pm 0,16$), *cat* ($0,003 \pm 0,0005$), *cyp1a1* ($0,31 \pm 0,07$) et *mt1* ($2,49 \pm 0,45$). Le gène *gpx* est également très exprimé à Bélisaire ($0,30 \pm 0,03$) et le gène *cat* à Eyrac ($0,04 \pm 0,02$).

Enfin *mxr* et *cat* sont différenciellement exprimés en **février 2011**, avec un niveau de transcription maximal atteint à Bélisaire (*mxr* : $0,11 \pm 0,06$; *cat* : $0,16 \pm 0,10$), Lt (*mxr* : $0,13 \pm 0,07$; *cat* : $0,17 \pm 0,07$) et Eyrac (*mxr* : $0,02 \pm 0,01$; *cat* : $0,07 \pm 0,02$).

Dans la **glande digestive** (Figure 71), *gst* ; *cat* et *sodmt* présentent des niveaux moyens d'expression maximums en février 2011 comme dans les branchies. Le gène *cyp1a1* est exprimé principalement en juillet 2010. Les gènes *gpx*, *mxr*, *sod*, *coxI*, *mt1* et *mt2* ne présentent cependant pas d'évolution significative dans le temps.

Les gènes *coxI*, *cat* et *sod* présentent des différences entre stations en **juillet 2010**. *Sod* est très exprimé à Le Tès ($1,27 \pm 1,23$) ; *cat* à Bélisaire et Grand Banc (Bé : $0,09 \pm 0,02$; Gb : $0,10 \pm 0,04$) et *coxI* à Arguin, Bélisaire et Eyrac (Ar : $142,8 \pm 60,9$; Bé : $150,2 \pm 51,2$; Ey : $114,2 \pm 47,4$).

En **octobre 2010**, les stations Le Tès et Eyrac expriment de façon significativement plus importante les gènes *gpx* (Ey : $0,42 \pm 0,07$), *gst* (Lt : $0,89 \pm 0,21$), *mxr* (Ey : $0,12 \pm 0,07$), *cat* (Lt : $0,07 \pm 0,03$; Ey : $0,22 \pm 0,09$), *sodmt* (Lt : $0,36 \pm 0,09$; Ey : $0,29 \pm 0,03$).

Enfin en **février 2011**, la station Bélisaire se distingue par des expressions importantes de *mxr* ($0,37 \pm 0,21$) et *sod* ($0,06 \pm 0,05$).

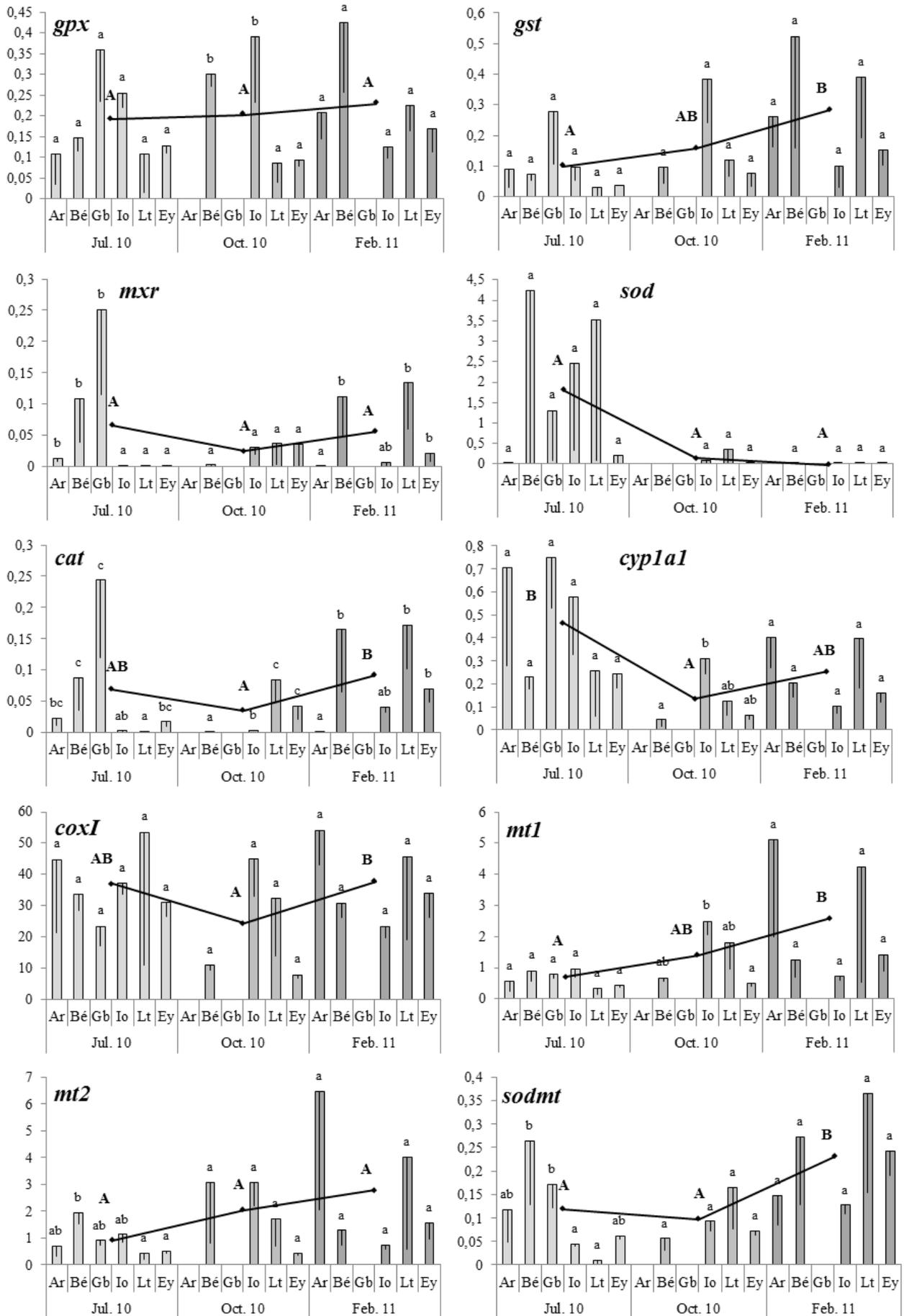


Figure 70 : Evolution des expressions géniques relatives de 10 gènes de stress dans les branchies des huîtres prélevées durant la première année du programme OSQUAR

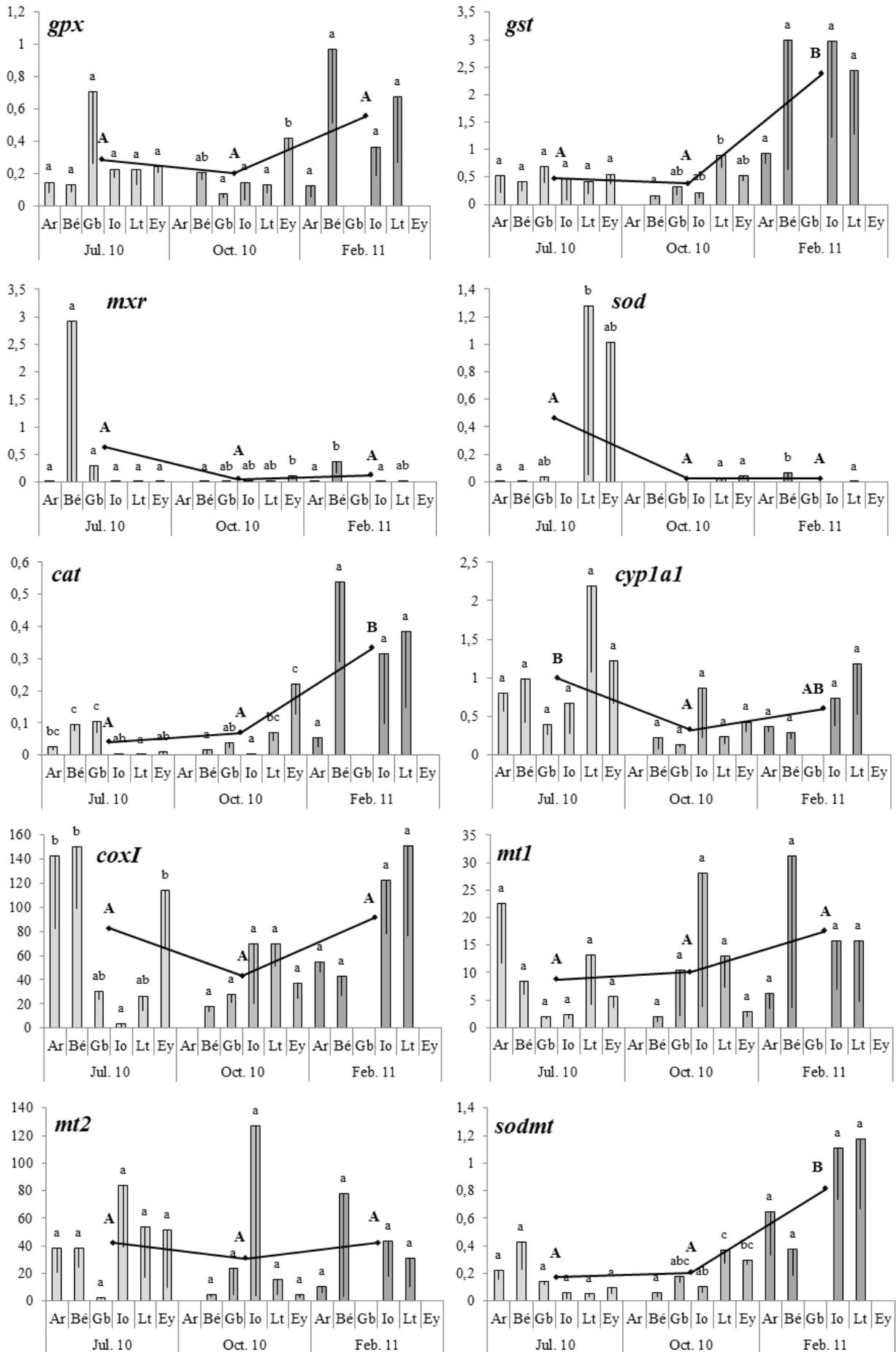


Figure 71 : Evolution des expressions géniques relatives de 10 gènes de stress dans les glandes digestives des huîtres prélevées durant la première année du programme OSQUAR

3.2.5.2. Année 2

Les données concernant la seconde année de suivi ont été traitées de la même manière que celle de la première année et sont présentées pour les branchies (Figure 72) et la glande digestive (Figure 73). Dans un souci de lisibilité, aucune lettre minuscule n'apparaît lorsque les stations ne présentent aucune différence entre elles pour un temps donné.

La **saisonnalité** apparaît dans les **branchies** au niveau de tous les gènes étudiés. La plupart des gènes étudiés présentent un niveau d'expression élevé ou moyen, stable de juillet 2011 à janvier 2012, une forte hausse en mai 2012, puis une chute significative des valeurs en septembre 2012. Ce phénomène est principalement visible pour les gènes *gst* et *mxr* qui présentent en plus une chute importante des niveaux d'expression en janvier 2012. Les niveaux de mai 2012 sont élevés pour presque tous les gènes étudiés, mais cette augmentation des valeurs n'est significative par rapport à janvier 2012 que pour *gst*, *mxr* et *cat*. Le gène *coxI* présente des variations légèrement différentes avec un niveau maximal atteint en janvier 2012 et une relative stabilité des valeurs le reste de la cinétique.

En **juillet 2011**, la station Ile aux oiseaux se caractérise par des expressions géniques supérieures pour *gpx* ($0,59 \pm 0,13$) et *mxr* ($0,20 \pm 0,04$). Aucun gène n'est différentiellement exprimé entre les différents sites en **octobre 2011**. La station Grand Banc se démarque en **janvier 2012** par de fortes expressions des gènes *mxr* ($0,10 \pm 0,02$), *cat* ($0,11 \pm 0,02$), et *cyp1a1* ($0,40 \pm 0,09$). Le gène *mxr* est aussi très exprimé à Bélisaire ($0,08 \pm 0,03$) et le gène *coxI* à Ile aux oiseaux ($20,7 \pm 7,5$). Seul le gène *sodmt* est exprimé différentiellement en **mai 2012**, avec un niveau maximal à Le Tès ($0,75 \pm 0,11$). Enfin, la station Ile aux oiseaux présente les niveaux les plus élevés en **septembre 2012** pour les gènes *gpx* ($0,11 \pm 0,01$) et *gst* ($0,09 \pm 0,02$).

Concernant la **saisonnalité** observée dans la **glande digestive**, certaines différences par rapport aux branchies apparaissent. Les niveaux globaux d'expression sont équivalents durant toute l'année à l'exception des mois de janvier 2012 et mai 2012 qui présentent des hausses importantes, significatives par rapport à juillet 2011 dans la plupart des cas. Les gènes *coxI*, *mt1* et *mt2* sont les seuls à présenter un modèle différent avec à l'inverse de forts niveaux en juillet 2011 et des chutes en mai 2012.

Tous les gènes sont exprimés de façon équivalente entre les différentes stations en **juillet 2011**, à l'exception de *mt1* qui présente une différence entre Le Tès et Eyrac ($0,69 \pm 0,08$ vs $2,72 \pm 0,22$). Les stations Arguin et Eyrac se distinguent en **octobre 2011** par de hauts niveaux d'expression pour les gènes *mxr* (Ey : $0,22 \pm 0,08$), *cat* (Ar : $0,22 \pm 0,07$; Ey : $0,23 \pm 0,14$) et *cyp1a1* (Ar : $0,33 \pm 0,01$; Ey : $0,66 \pm 0,23$). Des niveaux élevés d'expression de *gst* apparaissent en **janvier 2012** pour Arguin et Bélisaire (Ar : $1,84 \pm 0,23$; Bé : $1,61 \pm 0,14$). Le mois de **mai 2012** se caractérise par de hauts niveaux de transcription à Le Tès pour les gènes *cat* ($0,37 \pm 0,10$) et *cyp1a1* ($0,55 \pm 0,05$). La station Bélisaire se caractérise également par un fort niveau d'expression du gène *cyp1a1* ($0,65 \pm 0,15$) et du gène *coxI* ($65,19 \pm 35,22$). Enfin en **septembre 2012**, la station Bélisaire présente des niveaux supérieurs pour

les gènes *gst* ($0,75 \pm 0,16$), *sod* ($0,34 \pm 0,08$), *cat* ($0,31 \pm 0,06$) et *sodmt* ($0,35 \pm 0,03$). Le gène *mxr* est également surexprimé durant cette période à Arguin ($0,05 \pm 0,02$).

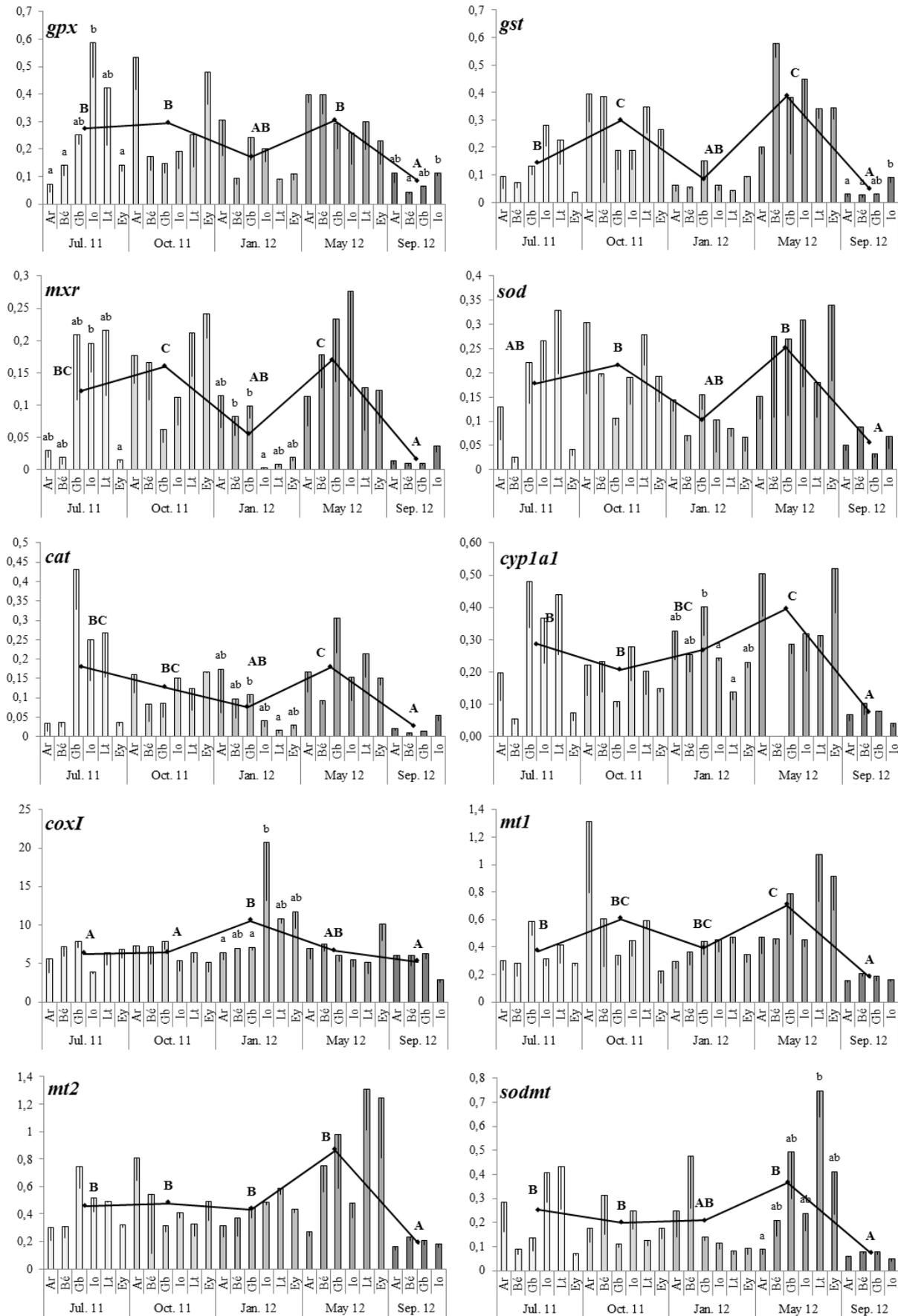


Figure 72 : Evolution des expressions géniques relatives de 10 gènes de stress dans les branchies des huîtres prélevées durant la deuxième année du programme OSQUAR

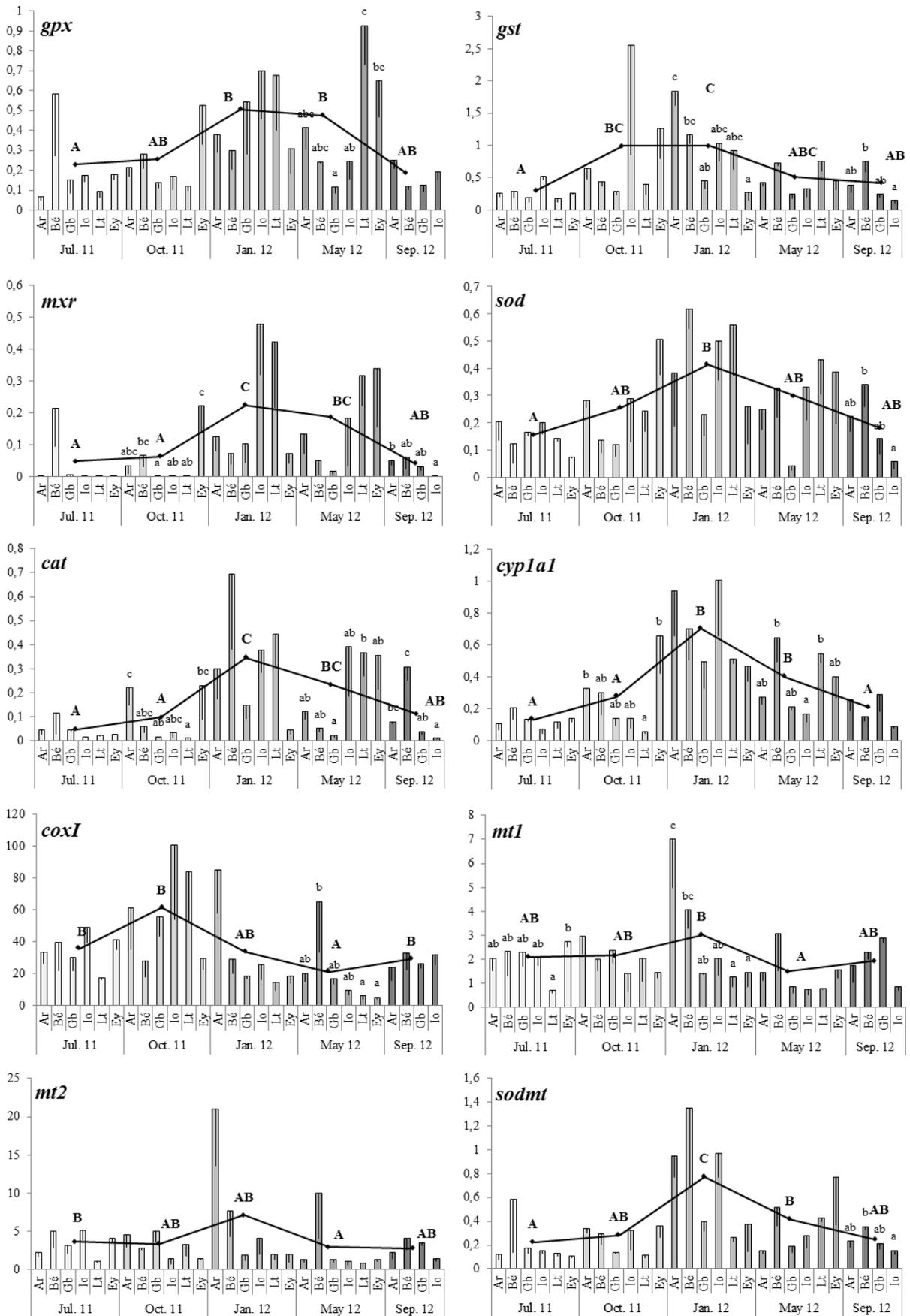


Figure 73 : Evolution des expressions géniques relatives de 10 gènes de stress dans les glandes digestives des huîtres prélevées durant la deuxième année du programme OSQUAR

3.2.6. Physico-chimie du milieu

Les données relatives à la physico-chimie du milieu ont été récupérées grâce au SOMLIT (<http://somlit.epoc.u-bordeaux1.fr/fr/>). Les variables retenues sont les mêmes que pour ASCOBAR (cf. Approche *in situ* : 2.2.6) et ont été moyennées pour chaque mois (n = 2) de juillet 2010 à septembre 2012 (Tableau 15), et ce pour les deux stations les plus représentatives de nos sites d'études : Bouée 13 (entrée du bassin, proche de Arguin, Bélisaire et Grand Banc) et Eyrac (au niveau de la ville d'Arcachon, proche de Ile aux oiseaux, Le Tès et Eyrac).

Tableau 15 : Paramètres physico-chimiques 2010 - 2011 des eaux des stations Bouée 13 et Eyrac (SOMLIT)

Mois	T (°C)		S (psu)		O (mL/L)		pH		MES (mg/L)		Chla (µg/L)	
	Bouée 13	Eyrac	Bouée 13	Eyrac	Bouée 13	Eyrac						
Juil. 10	20,6	22,8	34,8	34,0	5,2	4,8	8,2	8,2	2,3	3,0	1,2	2,7
Oct. 10	16,1	15,6	35,0	34,5	5,7	5,6	8,1	8,0	3,0	2,5	2,3	4,2
Fév. 11	10,4	9,3	33,8	32,4	6,5	6,5	8,2	8,1	3,8	2,0	4,4	4,1
Juil. 11	19,5	19,8	35,3	34,9	5,0	4,7	8,2	8,1	1,8	2,5	1,1	0,6
Oct. 11	18,9	19,1	35,4	35,0	5,4	5,1	8,2	8,1	3,2	3,0	3,0	2,5
Janv. 12	11,5	10,3	34,6	32,4	6,5	6,3	8,1	8,0	13,9	11,1	1,8	1,4
Mai 12	15,7	18,5	34,9	31,1	6,0	5,6	8,0	8,0	2,5	4,1	2,3	2,0
Sep. 12	18,8	19,6	35,4	35,1	5,6	5,2	8,1	8,0	4,5	7,1	1,6	1,6

L'amplitude thermique est plus importante à Eyrac qu'à Bouée 13 : l'eau est plus chaude en été à Eyrac (2010 : 22,8°C > 20,6°C ; 2011 : 19,8°C > 19,5°C ; 2012 : 19,6°C > 18,8°C) et plus froide en hiver (2011 : 9,3°C < 10,4°C ; 2012 : 10,3°C < 11,5°C). L'oxygène dissous dans l'eau présente des variations cohérentes avec les températures : les concentrations sont maximales lorsque l'eau est la plus froide (2011 : 6,5 mL/L ; 2012 : 6,3 – 6,5 mL/L) ; elles sont minimales lorsque les températures sont au plus haut (2010 : 4,8 – 5,2 mL/L ; 2011 : 4,7 – 5,0 mL/L ; 2012 : 5,2 – 5,6 mL/L).

La salinité diminue globalement durant les périodes hivernales et présente des niveaux inférieurs à Eyrac par rapport à Bouée 13 durant toute la période d'étude (Bouée 13 : de 33,8 psu à 35,4 psu ; Eyrac : 31,1 psu à 35 psu). La variable de pH ne permet pas de discriminer les deux sites.

L'évolution du paramètre de MES ne présente pas de tendance saisonnière nette, et la différence entre les deux stations varie avec la période considérée. Eyrac présente des niveaux supérieurs en été (2010 : 3,0 > 2,3 mg/L ; 2011 : 2,5 > 1,8 mg/L ; 2012 : 7,1 > 4,5 mg/L) mais inférieurs en hiver (2011 : 2,0 < 3,8 mg/L ; 2012 : 11,1 < 13,9 mg/L). Les concentrations sont homogènes sur la durée du suivi, hormis en janvier 2012 qui présente une valeur maximale très importante pour les deux stations (environ 4 fois les valeurs d'octobre 2011). La chlorophylle a varié de façon importante dans le temps sur la durée du suivi, avec une gamme de concentration équivalente entre les deux sites : de 1,1 µg/L à 4,4 µg/L pour Bouée 13 et de 0,6 à 4,2 µg/L pour Eyrac. Malgré des concentrations observées supérieures en 2010, la station d'Eyrac présente des niveaux équivalents à Bouée 13 sur la période 2011 – 2012. Les valeurs maximales sont mesurées en février 2011 (Bouée 13 : 4,4 µg/L ; Eyrac : 4,1 µg/L), en octobre 2011 (Bouée 13 : 3,0 µg/L ; Eyrac : 2,5 µg/L) et en mai 2012 (Bouée 13 : 2,3 µg/L ; Eyrac : 2,0 µg/L).

3.2.7. Analyse en composantes principales (ACP)

Quatre ACP ont été réalisées de la même manière que celles du suivi ASCOBAR afin de résumer les informations recueillies lors des deux années de suivi. Chacune d'entre elles (Figure 74 et Figure 75) concerne un organe (branchies ou glande digestive) et une année de l'étude. Dans un souci de clarté, seuls les variables et les individus les mieux représentés dans le plan factoriel et/ou contribuant le plus à l'inertie des axes ont été conservés. Les matrices de corrélations présentées précédemment pour ASCOBAR sont présentées en annexes (Annexe 1). Les données de physico-chimie du milieu (*T*, *S*, *O*, *MES*, *pH*, *Chla*) ont été obtenues grâce au réseau de surveillance littoral SOMLIT.

NB : Les expressions géniques relatives n'ont pas pu être employées pour compléter les ACP de l'année 1 car certaines lacunes dans le jeu de données induisaient la suppression des individus concernés dans l'analyse. Au regard du faible nombre d'individus durant cette année de suivi, un tel biais n'a pas semblé acceptable. Ces données pour l'année 2 ont été ajoutées en variables passives.

3.2.7.1. Pour les branchies

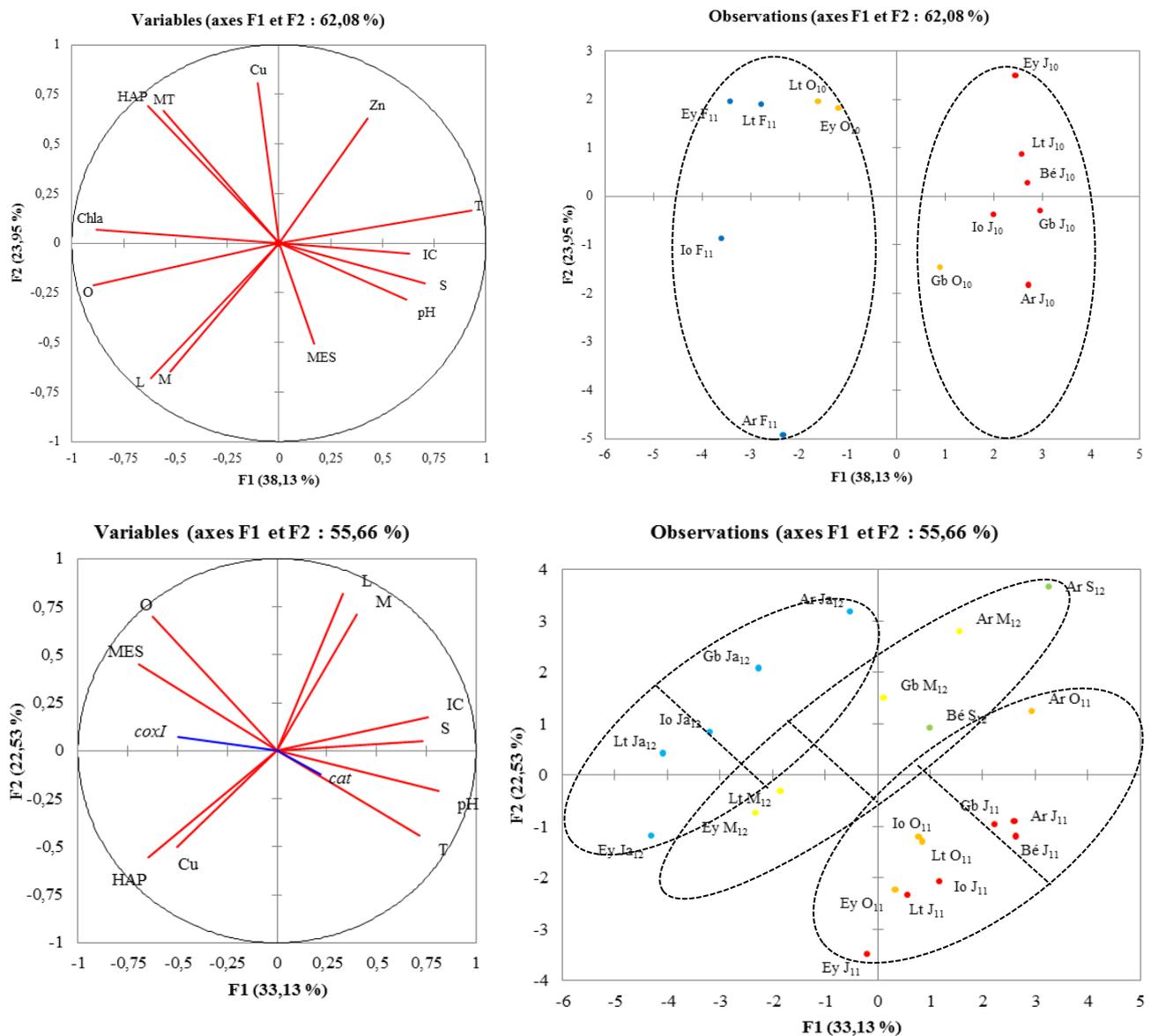


Figure 74 : Cercle des corrélations (à gauche) et projection des individus (à droite) - Analyse en Composantes Principales appliquées aux variables des branchies (OSQUAR année 1 en haut et année 2 en bas).

La **projection des variables** de la **première année** de suivi au niveau des branchies, est réalisée à partir des axes 1 et 2. En se basant sur les contributions relatives à l'inertie de chaque variable on observe que l'axe 1 oppose les variables T, IC et S aux variables HAP, Chla, O et L. L'axe 2 en revanche, oppose les variables HAP, Cu, Zn, MT aux variables MES, M et L. La matrice des corrélations et la représentation graphique des variables permet par ailleurs d'observer des corrélations significatives entre : (1) M, L et O ; (2) pH et IC ; (3) IC et T ; (4) T et S ; (5) MT, HAP et Cu. On observe également de fortes anti-corrélations entre : (1) T et M, L, Chla et O ; (2) O et IC, S ; (3) Zn et L, M ; (4) Chla et IC, S, pH ; (5) HAP et S, pH, MES. D'après la **projection des individus** dans le plan factoriel on constate par ailleurs, que l'axe 1 discrimine clairement la période de juillet 2010 (Ar, Bé, Gb, Lt, Ey), principalement caractérisée par de fortes valeurs prises pour les variables T, IC et S, à la période de février 2011 (Ar, Io, Lt, Ey) présentant de faibles valeurs pour ces variables mais de fortes valeurs en HAP, Chla, O et L. La période d'octobre 2010, moins bien représentée, se positionne de façon intermédiaire dans l'espace, indiquant des valeurs moyennes pour les variables citées. De la même manière, l'axe 2 permet d'observer une répartition des stations le long de l'axe, toutes périodes confondues. Les stations Le Tès et Eyrac se caractérisent ainsi par de fortes valeurs prises pour les variables HAP, Cu, Zn et MT tandis que les stations Arguin, Grand Banc et Ile aux oiseaux présentent des valeurs plus faibles pour ces variables et de fortes valeurs en MES, M et L. **Deux groupes** d'individus apparaissent donc : le premier constitué des stations en juillet 2010 et de Grand Banc en octobre 2010, et le second constitué des stations en février 2011 et de Le Tès et Eyrac en octobre 2010. La **deuxième année** de suivi dans les branchies présente des similitudes avec la première année. La **projection des variables** permet d'opposer sur l'axe 1 les variables IC, S, pH et T aux variables O, MES et HAP. L'axe 2 oppose les variables L, M et O aux variables HAP et Cu. La matrice des corrélations (Annexe 1) indique des corrélations entre : (1) M et L, IC ; (2) IC et T, S, pH ; (3) T et pH ; (4) S et pH ; (5) O et MES ; (6) HAP et Cu. Des anti-corrélations notables apparaissent aussi entre : (1) HAP et M, L, IC, S, pH ; (2) Cu et L, IC ; (3) O et L, S ; (4) pH et O ; (5) MES et IC, T, pH. Au niveau génétique, *coxI* est corrélé à MES et O, mais anti-corrélé à IC, T et S.

La **projection des individus** permet encore de discriminer les différents temps de prélèvements avec de manière globale la période de juillet et octobre 2011 présentant des coordonnées positives sur l'axe 1 et négatives sur l'axe 2. A l'inverse, la période hivernale de janvier 2012 se caractérise par des coordonnées négatives sur l'axe 1 mais positives sur l'axe 2. Les stations étudiées semblent de plus se répartir le long d'un axe diagonal selon lequel les sites Ile aux oiseaux, Le Tès et Eyrac présentent systématiquement des coordonnées plus faibles sur les deux axes par rapport aux sites Grand Banc, Bélisaire et Arguin au niveau de chaque temps de prélèvement. Cela correspond à de plus fortes valeurs en Cu et HAP des stations les plus orientales en comparaisons des stations occidentales caractérisées par de plus faibles valeurs pour ces variables et des niveaux supérieurs de croissance. **Trois groupes** peuvent donc être distingués : le premier constitué des stations étudiées en été-automne, le second basé sur la période de mai-septembre 2012, et le troisième basé sur le prélèvement hivernal de janvier 2012. Chaque groupe peut de plus être scindé en deux afin de discriminer les stations orientales des stations occidentales.

3.2.7.2. Pour la glande digestive

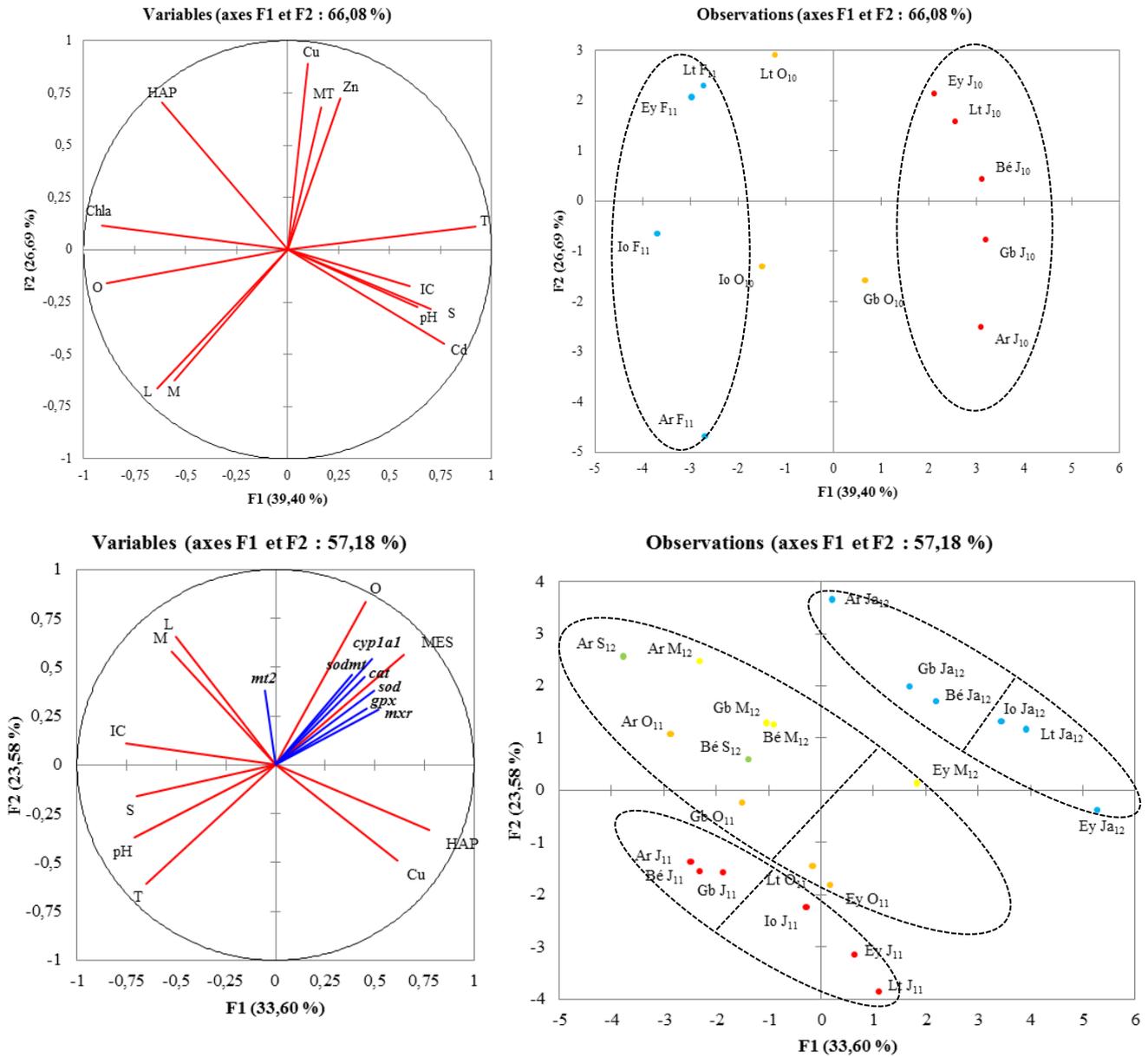


Figure 75 : Cercle des corrélations (à gauche) et projection des individus (à droite) - Analyse en Composantes Principales appliquées aux variables des glandes digestives (OSQUAR année 1 en haut et année 2 en bas).

La **projection des variables** concernant la **glande digestive** durant la **première année** de suivi indique une opposition selon l'axe 1 entre : T, pH, S, Cd et Chla, O, L. L'axe 2 quant à lui oppose les variables L, M aux variables HAP, Cu, Zn, MT. Des corrélations notables apparaissent entre : (1) M et L, O ; (2) L et O ; (3) IC et pH ; (4) T et Cd ; (5) S et Cd ; (6) Cu et MT ; (7) pH et Cd. Les anti-corrélations les plus significatives concernent : (1) M et T, Zn ; (2) L et T, Cu, Zn ; (3) IC et O, Chla ; (4) T et O, Chla ; (5) S et O, Chla, HAP ; (6) pH et Chla, HAP ; (7) Chla et Cd ; (8) HAP et Cd.

La **projection des individus** dans le plan factoriel oppose selon l'axe 1 la période de juillet 2010 (Ar, Bé, Gb, Lt) caractérisée par de fortes valeurs pour les variables T, pH, S et Cd à la période de février 2011 (Ar, Io, Ey) présentant de fortes valeurs en Chla, O et L. L'axe 2 en revanche, oppose plutôt les stations orientales Le Tès et Eyrac avec de hauts niveaux en HAP, Cu, Zn et MT aux stations occidentales, principalement Arguin, caractérisées par de fortes valeurs pour L et M. La période

d'octobre 2010 est encore positionnée de façon intermédiaire entre la période estivale et la période hivernale. **Deux groupes** d'individus identiques à ceux précédemment établis pour les branchies peuvent également être formés.

La **projection des variables** concernant la **seconde année** du programme permet d'opposer selon l'axe 1 les variables IC, T, S, pH aux variables Cu, MES, HAP. L'axe 2 oppose les variables M, L, O, MES aux variables Cu, T. La matrice des corrélations (Annexe 1) indique des corrélations significatives entre : (1) pH et IC, T, S ; (2) M et L, IC ; (3) IC et T, S, pH ; (4) O et MES ; (5) HAP et Cu. De la même manière on observe des anti-corrélations entre : (1) HAP et M, L, IC, S, pH ; (2) L et Cu ; (3) IC et Cu, MES ; (4) T et O, MES ; (5) O et pH ; (6) pH et MES. Les variables d'expression génique ajoutées à l'analyse en tant que variables passives, présentent une qualité de représentation moyenne mais sont presque toutes significativement corrélées entre elles hormis *mt2*. Les expressions de presque tous les gènes sont par ailleurs fortement corrélées aux variables O et MES, mais anti-corrélées à T et S.

La **projection des individus** permet au regard des contributions relatives des individus à l'inertie des axes et des qualités des représentations, d'opposer la période estivale de juillet 2011 présentant des coordonnées négatives sur les deux axes, à la période hivernale de janvier 2012 présentant des coordonnées positives sur les deux axes (sauf Ey en janvier 2012). Les périodes de mai 2012 et octobre 2011 se positionnent de manière intermédiaire entre les périodes hivernales et estivales, tandis que le mois de septembre 2012 est sous représentés. A l'instar des constats réalisés précédemment dans les branchies, on observe que les stations se répartissent dans le plan factoriel le long d'un axe diagonal selon lequel les stations Arguin, Bélisaire et Grand Banc présentent systématiquement des coordonnées inférieures sur l'axe 1 et supérieures sur l'axe 2 par rapport aux sites Ile aux oiseaux, Le Tès et Eyrac. Cette observation correspond à de plus fortes accumulations en Cu, et HAPs au niveau des sites orientaux par rapport aux stations Grand Banc, Bélisaire et Arguin dont les huîtres présentent une contamination inférieure et une croissance supérieure.

3.3. Discussion

L'étude de terrain proposée ici constitue la suite de l'approche *in-situ* menée en 2009 – 2010 lors du programme ASCOBAR. Bien que la cinétique adoptée soit différente (prélèvements saisonniers) de nombreuses tendances sont communes entre les différentes années de suivi et ont déjà été discutées précédemment. Les tendances observées précédemment seront donc brièvement rappelées (encadrés) et la discussion sera principalement orientée sur les points communs et les différences observées entre les différentes années de suivi.

3.3.1. Croissance et reproduction des huîtres transplantées

Une forte hétérogénéité spatiale avait déjà été mise en évidence en 2009 – 2010 concernant la croissance des organismes. Les stations Lt et Ey n'avaient pas présenté d'augmentation significative de masse fraîche, ni de longueur de coquille en dépit d'apports nutritifs équivalents aux sites les plus occidentaux de l'étude. L'implication de la contamination chimique du milieu a donc été supposée dans ce retard de croissance au regard des concentrations élevées en métaux et HAPs obtenues dans les organismes. Un effort de reproduction équivalent à celui des autres stations a cependant été observé par des chutes marquées des indices de conditions en été.

Cette **hétérogénéité spatiale** se retrouve durant les deux nouvelles années de suivi du programme OSQUAR. Le site d'Arguin présente encore une croissance somatique supérieure aux autres durant les deux années. Les niveaux les plus faibles de **croissance** sont toujours observés au Tès mais aussi à Eyrac dans une moindre mesure.

On constate cependant que le gradient géographique établi durant ASCOBAR est moins net durant le suivi OSQUAR, principalement au niveau de la **première année**. De plus, les données de chlorophylle a du SOMLIT Arcachon indiquent que le mois d'octobre 2010 a été marqué par des niveaux deux fois plus élevés au niveau des stations orientales ($4,2 \mu\text{g/L} > 2,3 \mu\text{g/L}$) en comparaisons des sites les plus occidentaux. La ressource nutritive jouant un rôle majeur dans le développement somatique de l'huître (Barillé et al., 2011; Powell et al., 2002) ce facteur a pu optimiser la croissance au niveau des sites les plus internes. Le suivi de la reproduction par l'IFREMER en 2011 est par ailleurs associé à un suivi de la température haute fréquence indiquant des températures particulièrement hautes en début d'automne (environ 21°C début octobre à Eyrac), susceptibles d'influencer la croissance des huîtres (Maurer et al., 2011). Cette observation est confirmée par les données SOMLIT qui indiquent des températures en octobre 2011 ($19,1^\circ\text{C}$ à Eyrac) équivalente à celle du mois de juillet 2011 ($19,8^\circ\text{C}$ à Eyrac).

Les résultats obtenus au cours de la **deuxième année** de suivi sont plus cohérents avec les observations réalisées durant ASCOBAR en ce qui concerne les longueurs de coquilles. On constate cependant de manière surprenante que les masses fraîches n'indiquent aucune différence entre les stations, hormis une nette dominance d'Arguin, potentiellement en lien avec une meilleure qualité du milieu. La saisonnalité observée lors de la deuxième année de suivi présente quelques différences avec la première. La cinétique adoptée étant plus longue, cette année de suivi traverse deux saisons de

reproduction : la fin de celle de 2011, et celle de 2012 dans sa totalité. On observe donc une reprise de la croissance somatique en fin de cinétique cohérente avec la fin de la saison de reproduction.

A l'instar des observations faites durant ASCOBAR, les **indices de conditions** présentent des chutes liées à la reproduction au niveau de presque toutes les stations après la période estivale en **2010 – 2011**. Les stations les plus « externes » (Arguin, Bélisaire, Grand Banc) ne présentent cependant pas ces variations. L'utilisation des masses sèches recommandées dans la littérature (Lucas et Beninger, 1985) au lieu des masses fraîches auraient probablement permis une mesure plus précise des indices de conditions et une détection potentielle des évènements de pontes pour ces stations.

On observe par ailleurs sur la **deuxième année** de suivi un décalage des chutes d'indices de condition dans le temps. La diminution des valeurs paraît progressive entre l'été et l'hiver et retrace mal les pertes de masses liées aux émissions gamétiques pourtant datées de mi-juillet par l'IFREMER. Ce phénomène peut-être mis en lien avec le faible effort de reproduction mis en évidence par l'institut durant cette saison, caractérisée par de nombreuses petites émissions gamétiques (Maurer et al., 2011). Les données du SOMLIT indiquent par ailleurs que les températures mesurées en octobre 2011 sont presque identiques à celles mesurées en juillet (19-20°C). Elles sont de plus associées à un pic de chlorophylle a, ce qui semble favorable au maintien de l'activité de reproduction tard dans l'été et à une croissance importante comme observé à Arguin et Eyrac. Ces circonstances ont pu contribuer à maintenir des valeurs élevées d'indices de condition tard dans l'année. Les chutes observées en janvier 2012 sont donc probablement liées à un simple amaigrissement hivernal des organismes (Alunno-Bruscia et al., 2011) en lien avec une diminution de la quantité de nourriture comme les données SOMLIT l'indiquent. La diminution des températures pourrait par ailleurs influencer le taux de filtration et d'ingestion comme cela a été démontré chez les larves de *Crassostrea gigas* (Rico-Villa et al., 2009) et les adultes (Bougrier et al., 1995).

La seconde année de suivi permet également « d'encadrer » la période de reproduction de 2012. L'augmentation des indices de conditions entre janvier et mai est donc caractéristique d'une prise de masse liée à la gamétogenèse (Alunno-Bruscia et al., 2011). Néanmoins, seule la station de Grand Banc présente une chute liée à l'émission gamétique en septembre. Ce phénomène peut s'expliquer par un retard exceptionnel du frai observé cette année-là par l'IFREMER (Perrière-Rumèbe, 2012). L'émission principale a en effet eu lieu à la fin du mois d'août, ce qui n'avait jamais été observé auparavant. Ce retard est en partie expliqué par l'institut du fait de faibles niveaux nutritifs mesurés en début d'année pendant la gamétogenèse. Une autre piste soulevée serait le rôle potentiel de la contamination chimique du milieu. Nos données cependant n'indiquent pas de niveaux de contamination supérieurs cette année en comparaison des années précédentes. Le suivi de certains perturbateurs endocriniens dans l'eau pourrait être une piste intéressante. Ces observations sont cependant réalisées *in-situ*, et résultent probablement de l'interaction de nombreux facteurs biotiques et abiotiques.

En conclusion, les tendances observées durant le suivi *in-situ* OSQUAR sont cohérentes avec celles observées durant la seconde année de suivi ASCOBAR. Arguin présente toujours des croissances maximales et les sites les plus orientaux tels que le Tès et Eyrac présentent des croissances moins

importantes en lien avec une qualité du milieu inférieure. Le gradient géographique précédemment établi est cependant moins net, ce qui reflète les différences interannuelles de paramètres abiotiques telles que la température et de disponibilité de la ressource nutritive (évaluée par la chlorophylle a). Les variations d'indices de condition présentent toujours des variations liées à la gamétogenèse, mais n'ont pas permis de détecter les frais en 2011 – 2012 du fait d'un faible effort de reproduction. Cet indicateur met tout de même en évidence une saisonnalité liée à un amaigrissement durant la période hivernale. Ces variations interannuelles soulignent la complexité du milieu naturel et sont le résultat d'interactions difficiles à appréhender dans le cadre de cette étude.

3.3.2. La contamination des organismes transplantés

3.3.2.1. Par les métaux

Le suivi réalisé en 2009 – 2010 avait mis en évidence un gradient de contamination croissant allant de l'extérieur de la lagune vers l'intérieur. Cette observation avait été mise en lien avec les apports supérieurs dus aux activités nautiques et aux rejets urbains associés à un hydrodynamisme inférieur. Arguin présentait les contaminations les plus faibles en cuivre, zinc et cadmium, hormis dans la glande digestive. Cet organe indiquait une tendance opposée avec des concentrations supérieures dans les stations les plus externes. Les voies de contamination suspectées étaient dissoutes et trophiques pour le cuivre et le zinc, mais essentiellement trophiques pour le cadmium. Les évolutions saisonnières au niveau de chaque site avaient été attribuées aux variations de masses des organismes (dilution pondérale) et au statut de métal essentiel du cuivre et du zinc.

Les **tendances inter-stations** concernant la contamination en **cuivre** et en **zinc** sont globalement les mêmes durant le suivi OSQUAR que celles observées durant le suivi ASCOBAR. Le gradient de contamination est particulièrement marqué durant la deuxième année de suivi : de environ 100 µg Cu/g, ps à Arguin à 700 µg Cu/g, ps à Eyrac dans les branchies ; de environ 2000 µg Zn/g, ps à Arguin à 3000 µg Zn/g, ps au Tès dans le même organe. Pour le **cadmium** en revanche, la station du Tès ne se distingue plus. Elle semble « remplacée » par le site de Grand Banc durant la seconde année de suivi, qui montre la contamination la plus forte (environ 7 µg Cd/g, ps dans les branchies et 8 µg Cd/g, ps dans la glande digestive). La glande digestive présente toujours des accumulations supérieures en cadmium au niveau des sites externes, potentiellement liés à un apport par voie trophique d'origine encore inconnue.

Les **niveaux atteints** diffèrent entre l'année 1 et l'année 2, ce qui peut être mis en lien avec les différences dans la durée du suivi. Les organismes de la seconde année de transplantation ont passé plus de temps en contact avec les contaminants et ont donc plus bioaccumulés de métaux (ex : environ 200 µg Cu/g, ps à la fin de l'année 1 contre environ 500 µg Cu/g, ps à la fin de l'année 2 dans la glande digestive). Les observations concernant le gradient géographique de contamination sont donc cohérentes d'une année sur l'autre. Elles peuvent encore être associées à une interaction entre l'hydrodynamisme inférieur (Plus et al., 2009) de l'intérieur de la lagune favorisant la rétention des

polluants au niveau des sites orientaux et le rejet supérieur de contaminants (Devier et al., 2005) associé à leur proximité des villes et des ports.

En termes de **variations saisonnières**, le cuivre, le zinc et le cadmium présentent une évolution en **2010 - 2011** comparable à celle observée durant ASCOBAR. Le cuivre et le zinc présentent cependant une saisonnalité moins nette que le cadmium dans les branchies et la glande digestive. Les variations observées rappellent les résultats du suivi ASCOBAR et peuvent être attribuées à des processus de dilutions pondérales, comme en atteste l'anticorrélation entre les accumulations métalliques et les paramètres de croissance indiquée par les ACP. Les restes du corps présentent souvent une tendance inverse caractérisée par des augmentations des concentrations métalliques entre juillet 2010 et octobre 2010. Cela tient au fait que cet organe contient entre autres les gonades de l'animal. Les frais peuvent donc être caractérisés par une diminution de masse et une concentration des contaminants.

L'année **2011 - 2012** présente en comparaison certaines originalités concernant les **variations saisonnières**. Presque aucun phénomène de dilution pondérale n'est observable. Seule la station Grand Banc présente de fortes hausses en **cuivre** et en **zinc** dans les branchies et la glande digestive, ce qui peut être lié aux pertes de masses de chair fraîche observées en fin de suivi pour ce site. Ces hausses de concentrations se généralisent aux autres sites externes dans les restes du corps, mais sont tardives, ce qui peut être associé aux pontes de l'été 2012 et/ou un arrêt de croissance hivernal observable par la stabilisation des masses fraîches en janvier 2012. Ces deux métaux sont cependant essentiels et donc sujets à une régulation interne qui entre en compétition avec les autres facteurs influençant la contamination.

Il semble que les variations de masse des organismes aient également affecté les concentrations en **cadmium** durant cette année de suivi, principalement au niveau d'Arguin. En effet, des diminutions sont observables en début de cinétique, en lien avec les gains de masse associés mais également en fin de cinétique dans les restes du corps, en lien avec une maturité sexuelle tardive observée à cette station. Toutes les stations présentent par ailleurs une forte augmentation des concentrations en cadmium dans les branchies et la glande digestive entre janvier et septembre 2012 (facteur 2 à 3 : de 2 µg Cd/g, ps à 6 µg Cd/g, ps dans la glande digestive à Bélisaire). Les hausses observées entre mai et septembre 2012 peuvent encore être attribuées aux émissions gamétiques. La période allant de janvier à mai 2012 en revanche se caractérise cependant par de forts gains de masse fraîche, ce qui est contradictoire avec une hausse des concentrations. Il semble donc que les variations de masses ne soient pas les seuls facteurs intervenant dans la contamination des organismes par le cadmium. On peut supposer qu'une activité ventilatoire croissante durant le printemps 2012 en lien avec la hausse des températures, une augmentation de l'abondance phytoplanctonique et la forte demande énergétique associée à la gamétogenèse a pu favoriser la contamination durant ce début d'année 2012. La sortie de l'hiver début 2012 et le printemps qui y a succédé ont par ailleurs été caractérisés par des abondances phytoplanctoniques supérieures liées aux variations naturelles de ce paramètre (Glé et al., 2008, 2007; Tortajada et al., 2012) qui a pu servir de vecteur à la contamination observée.

En conclusion, à l'instar des observations réalisées durant ASCOBAR, un gradient géographique de contamination par les métaux a pu être mis en évidence, avec des niveaux supérieurs atteints dans les

huîtres des stations les plus orientales. Les raisons supposées de ce gradient sont une pression anthropique supérieure à l'intérieur de la lagune en lien avec des apports supérieurs en contaminants et un hydrodynamisme moins important. L'évolution saisonnière des paramètres de bioaccumulation est par ailleurs moins marquée durant le suivi OSQUAR, ce qui peut être lié à une cinétique moins longue durant la première année. Une anticorrélation de ces paramètres avec les variations de masses des organismes est néanmoins toujours mise en évidence. L'interaction complexe entre l'évolution de la masse des organismes et des paramètres abiotiques (température, ressource nutritive) ou biotiques (taux de filtration, gamétogenèse) rend toutefois l'interprétation complexe, et constitue une source de variabilité interannuelle notable.

3.3.2.2. Par les HAPs

Le suivi ASCOBAR avait mis en évidence un gradient de contamination similaire à celui observé pour les métaux. La voie de contamination majoritaire supposée est trophique, impliquant de ce fait un rôle important des particules dans le processus. Dans ce contexte la contamination des sédiments a pourtant montré une relation très limitée avec la contamination du compartiment biotique. Ce constat a été attribué à l'hétérogénéité granulométrique et à la variabilité de teneur en matière organique au sein du sédiment. Une implication potentielle des activités nautiques dans la contamination estivale de certaines stations a été supposée.

Les **deux nouvelles années de suivi** réalisées permettent de retrouver rigoureusement le même gradient de contamination en lien avec des variations géographiques concernant les apports et l'hydrodynamisme. Le découplage entre la contamination du compartiment biotique et du compartiment sédimentaire apparaît encore en dépit d'une relation établie entre les deux paramètres dans la littérature (Geffard et al., 2003) et des empreintes moléculaires similaires observées.

La corrélation entre les concentrations en HAPs dans les sédiments et la teneur en matière organique est par ailleurs significative d'après nos données, ce qui explique les faibles concentrations mesurées dans les sédiments d'Arguin, Grand Banc et Eyrac qui sont très sableux et pauvres en carbone organique. On peut donc supposer que la source de HAPs pour les huîtres est multiple : trophique en premier lieu et probablement « particulaire » dans une moindre mesure (remise en suspension du sédiment) au niveau de stations telles que Bélisaire ou le Tès qui présentent simultanément de forts niveaux en hydrocarbures dans les huîtres et dans le sédiment.

Les concentrations en HAPs normalisées par les teneurs lipidiques indiquent des différences inter-sites similaires aux données non normalisées. Les variations de concentration présentent par ailleurs une anticorrélation par rapport aux taux lipidiques. La saisonnalité de la contamination en HAPs est donc potentiellement impactée par la gamétogenèse, qui induit un pic de lipides théoriquement centré sur le mois de juin. Ces taux sont cependant aussi tributaires des apports nutritifs qualitativement et quantitativement. De plus, les apports en HAPs ne sont pas constants à l'année, comme en attestent les valeurs de juillet 2011 observées au Tès et à Eyrac (environ 5000 – 6000 ng 16 HAPs/g, lp) potentiellement liées à une activité nautique accrue. La saisonnalité de ce paramètre dépend donc à la fois de paramètres environnementaux liés à la ressource nutritive et aux apports en contaminants,

comme de processus biologiques liés à la reproduction et à la métabolisation ce qui rend l'interprétation des données complexe.

En conclusion, le suivi OSQUAR permet de retrouver des résultats similaires au suivi ASCOBAR, avec un gradient géographique de contamination marqué. Le découplage entre la contamination des compartiments biotiques et sédimentaires, indique cependant que le sédiment n'est probablement pas la source majeure de contamination des huîtres. On peut raisonnablement supposer que la voie trophique joue un rôle majeur dans cette contamination, par l'intermédiaire notamment du phytoplancton. Une étude plus approfondie de l'empreinte moléculaire de ce compartiment particulière pourrait confirmer cette hypothèse. Le rôle du nautisme dans l'aggravation de cette contamination en été n'est par ailleurs pas exclu.

3.3.3. Le suivi des biomarqueurs

3.3.3.1. Les métallothionéines

Durant l'étude *in-situ* menée en 2009 – 2010, une corrélation a été mise en évidence entre la production de MTs et les concentrations en métaux, cohérente avec le rôle physiologique de cette protéine (Amiard et al., 2006). Cette observation était confirmée par les ACP réalisées qui indiquaient graphiquement la corrélation entre ces paramètres. Les HAPs qui ne sont pas connus pour être pris en charge par les MTs semblent avoir induit une production de protéines, probablement en lien avec le stress oxydant causé par ces contaminants (Ruttkay-Nedecky et al., 2013). Les variations attendues associées aux émissions gamétiques n'ont cependant pas été observées.

Des aléas liés à la conservation des échantillons n'ont pas permis d'obtenir les résultats de la seconde année de suivi. Les valeurs obtenues pour la première année permettent néanmoins de mettre en évidence des tendances similaires. Les branchies indiquent entre autres des niveaux supérieurs au niveau de la station Eyrac qui présentait les concentrations en cuivre et zinc les plus élevées avec le site du Tès. De la même manière, les niveaux relativement élevés de MTs mesurés au niveau des stations externes dans la glande digestive peuvent être liés à la bioaccumulation en cadmium ; bien que cette corrélation ne soit pas mise en évidence par les ACP.

Les modulations liées à la reproduction sont encore une fois peu observables, hormis au niveau de la station Grand Banc. Cette observation peut être mise en lien avec l'espacement des différents temps de prélèvement qui n'a peut-être pas permis de détecter les chutes de concentrations liées aux émissions gamétiques. En effet, les huîtres dans le Bassin d'Arcachon sont capables de réaliser plusieurs frais durant une même saison de reproduction, impliquant une production de gamètes *de novo* après chaque émission. En supposant que chaque production de gamètes induit une production de MTs, un espacement du suivi pourrait empêcher de détecter à temps les chutes de protéines liées au frai principal. Les corrélations observées en 2009 sont également observables au niveau des ACP réalisées pour les deux organes d'intérêt, principalement avec le cuivre.

Les résultats du suivi OSQUAR sont donc cohérents avec les observations réalisées en 2009 – 2010 et montrent une relation étroite entre la production de la protéine et l'accumulation de contaminants tels que les métaux ou les HAPs pouvant induire un stress oxydant à l'origine d'une production de MTs.

3.3.3.2. Les expressions géniques relatives

Les observations du suivi ASCOBAR avaient mis en évidence des tendances saisonnières marquées, mais n'avaient pas permis de discriminer les différentes stations de manière nette. Peu de différences entre les deux organes étudiés ont été observées, hormis une signature de la gamétogenèse plus marquée dans la glande digestive. Les niveaux élevés en été ont été attribués à une interaction entre de fortes températures, un effet potentiel du nautisme et un investissement énergétique fort dans les processus reproductifs au détriment des défenses antioxydantes. Les niveaux élevés d'expression détectés en hiver ont été attribués à une interaction entre le stress lié à la famine, une présence potentielle de pesticides (résurgence de la nappe) et l'absence du stress lié à la reproduction.

Les résultats obtenus pendant la **première année** de suivi, présentent une bonne cohérence avec les conclusions émises précédemment. De nombreux gènes, y compris *cat* qui n'était pas étudié durant ASCOBAR ou *sodmt* et *gst* indiquent dans les deux organes étudiés des niveaux minimaux d'expression en juillet 2010 et des niveaux maximaux en février 2011. Cette tendance est cependant plus marquée dans les branchies. Le lien supposé précédemment entre l'absence de nourriture en hiver et de hauts niveaux d'expression est toutefois difficile à établir ici, dans la mesure où aucune corrélation significative entre chlorophylle a et expression génique n'a pu être faite. Les données SOMLIT indiquent par ailleurs de fortes abondances phytoplanctoniques en février 2011, ce qui est en désaccord avec l'hypothèse d'un effet « famine ». On peut cependant supposer que les conditions climatiques hivernales ont favorisé l'entrée de contaminants dans la lagune, participant de ce fait à une réponse génétique chez des organismes non stressés par la reproduction (David et al., 2007). Le gène *cyp1a1* dont l'expression était déjà marquée par la gamétogenèse en 2009, présente encore ici une tendance opposée aux autres avec des niveaux élevés en juillet associés à la reproduction, au rôle potentiel de cette enzyme dans la synthèse hormonale (Rewitz et al., 2006) ou à la métabolisation des xénobiotiques. On notera cependant que la cinétique de la première année d'OSQUAR est plus courte, et certaines lacunes dans les données « fragilisent » l'analyse statistique (notamment pour *sod*).

Les analyses de la **deuxième année** de suivi présentent une certaine cohérence avec les affirmations précédentes, en particulier au niveau de la **glande digestive**. Cet organe se caractérise par des niveaux d'expression bas en juillet 2011 et élevés en janvier 2012 pour 7 gènes sur 10, incluant *cyp1a1* qui en cela se distingue des observations faites en 2010. L'étude des données environnementales du SOMLIT, indiquent entre autre que le mois de janvier 2012 a été caractérisé par de très hauts niveaux de matières en suspension (13 à 14 mg/L) en comparaison au reste de l'année (2 à 4 mg/L). La corrélation entre ce facteur et les expressions de nombreux gènes a par ailleurs été mise en évidence par l'ACP correspondante. Au regard des précipitations hivernales supérieures, on ne peut donc pas exclure le rôle du climat dans l'apport de matériel terrigène par les affluents du Bassin d'Arcachon tels

que la Leyre. Ce matériel, en cas de contamination et couplé aux facteurs présentés pour le suivi ASCOBAR (peu de chlorophylle a, pas de gamétogenèse et potentiel apport de pesticides), a pu contribuer à l'augmentation des expressions géniques observées. Des surexpressions de *hsp* ont en effet déjà été reportées face à une re-suspensions de sédiments fins contaminés par des métaux (Cho et Jeong, 2012). Les conditions climatiques hivernales sont connues pour augmenter l'hydrodynamisme (Plus et al., 2009) ; ce qui a pu par ailleurs favoriser une remise en suspension de matériel potentiellement contaminé. Une analyse du compartiment particulaire aurait permis d'élucider ce point.

Les résultats obtenus dans les **branchies** cette année présentent toutefois des différences notables. A l'instar de la glande digestive, la plupart des expressions géniques présentent une corrélation significative entre elles. Toutefois, presque aucune corrélation avec les variables considérées n'a été mise en évidence par l'ACP, ce qui indique un déterminisme complexe ne pouvant se résumer à un simple effet des paramètres environnementaux. On peut encore supposer que ces expressions dépendent de l'interaction de nombreux facteurs biotiques et abiotiques.

Les niveaux d'expression dans cet organe sont équivalents entre juillet 2011 et janvier 2012, à la différence de la glande digestive. Seul le gène *coxI* présente une augmentation notable en janvier 2012, qui ne se retrouve pas pour le gène *sodmt*, limitant donc l'hypothèse d'un stress oxydant au niveau de la mitochondrie. On observe donc une modulation du métabolisme énergétique durant ce mois d'hiver, qui n'est pas associée à des surexpressions de gènes impliqués dans la défense antioxydante, ce qui indique un stress moindre au niveau des branchies en 2012 par rapport aux années précédentes. Cette observation souligne le fait que les réponses observées en janvier dans la glande digestive sont étroitement liées au métabolisme de la nutrition, et donc potentiellement à une contamination par voie trophique associée aux forts niveaux de matières en suspensions mesurés. On peut supposer que la présence de MES dans la colonne d'eau et les faibles températures ont contribué à une diminution de l'activité de filtration. Une baisse de l'activité ventilatoire peut potentiellement être reliée à une production d'EROs réduite, ce qui peut expliquer les niveaux bas d'expressions génique mesurés.

La suite de la cinétique de 2012 présente l'avantage de « traverser » un nouvel épisode de reproduction. Le prélèvement de mai 2012 indique ainsi un pic d'expression pour la quasi-totalité des gènes étudiés dans les branchies, suivi d'une chute drastique des niveaux transcriptomiques en septembre. Ce phénomène peut être associé à la forte demande énergétique liée à la gamétogenèse en mai, et aux conséquences de la ponte en septembre (Li et al., 2007; Y. Li et al., 2009a). La reproduction est pourtant l'un des facteurs précédemment évoqués comme ayant pu causer les chutes d'expression génique du système antioxydant en été. L'observation faite en mai 2012, souligne donc le fait que de faibles niveaux transcriptomiques en juillet ne peuvent être seulement attribués à la gamétogénèse, mais plutôt à une potentielle interaction entre les processus biologiques impliqués (Farcy et al., 2007; Fleury and Huvet, 2012; Huvet et al., 2010), de fortes températures et une pression anthropique supérieure (lien potentiel avec les activités nautiques). Notre étude corrobore ces hypothèses et indiquent que de complexes interactions entre la gamétogenèse et les paramètres environnementaux peuvent être à l'origine d'une réduction des défenses antioxydantes chez les

huitres. Ces phénomènes sont cependant moins marqués dans la glande digestive, ce qui peut s'expliquer par le fait que cet organe présente des niveaux d'expression supérieurs à la branchie. Les niveaux de base sont donc probablement en partie suffisants dans cet organe pour répondre au stress oxydant induit par la gamétogenèse.

***En conclusion,** certaines tendances concernant la saisonnalité des niveaux transcriptomiques des gènes de stress se retrouvent durant le suivi OSQUAR : de fortes hausses en hiver particulièrement marquées dans la glande digestive en lien avec des apports en polluants durant cette période de forte pluie, et des chutes marquées en été liées à l'interaction de la gamétogenèse avec les facteurs abiotiques. Les stades plus précoces de gamétogenèse ont cependant été associés à de forts niveaux d'expressions en mai, soulignant l'importance de ce processus dans la réponse antioxydante de l'huître creuse. Une forte variabilité interindividuelle des niveaux d'ARN rend cependant l'extraction de tendances inter-stations difficile, et aucune hétérogénéité spatiale nette n'a pu être mise en évidence durant le suivi OSQUAR. On notera enfin les différences entre branchies et glande digestive associées aux niveaux de bases différents entre ces deux organes.*

3.3.4. Les paramètres physico-chimiques du milieu

Les variations saisonnières de température en 2009 – 2010 présentaient des variations cohérentes avec les saisons (de 9°C en hiver à 22°C en été). La gamme de concentration en oxygène dans l'eau s'étendait de 4,9 à 6,8 mL/L et présentait des variations cohérentes avec la température de l'eau (oxymétrie plus faible dans les eaux chaudes). L'influence des apports en eau douce de la Leyre ont été mise en évidence avec une gamme de salinité plus basse à Eyrac (de 30 psu à 33,7 psu) par rapport à Bouée 13 (de 33,6 psu à 35,3 psu). Les concentrations en MES étaient légèrement plus élevées à Bouée 13 (influence potentielle de l'hydrodynamisme dans les passes du bassin) et allaient de 1,8 à 7 mg/L. A l'inverse les niveaux de chlorophylle a mesurés étaient supérieurs à Eyrac (de 0,5 à 2,4 µg/L) ce qui a été mis en lien avec l'influence continentale de la Leyre et les apports en nutriments associés.

Les températures observées en 2011 – 2012 sont similaires à celles observées en 2009 et s'étendent de 9 à 23°C. Il en est de même pour la concentration en oxygène dissous qui répond au facteur « température » de façon cohérente avec des niveaux minimaux en été (4,7 mL/L) et maximaux en hiver (6,5 mL/L). Bien que toujours inférieure à celle de Bouée 13 (influence de l'eau douce de la Leyre), la salinité mesurée à Eyrac est tout de même légèrement supérieure à celle mesurée en 2009 puisque les valeurs observées vont de 31,1 psu à 35 psu, ce qui se rapproche de valeurs océaniques. Le pH présente des niveaux similaires à 2009 (aux alentours de 8,1).

Les concentrations en MES à Bouée 13 ne sont plus systématiquement supérieures à celles mesurées à Eyrac comme en 2009. Cette situation semble apparaître exclusivement en hiver, ce qui peut encore être lié à l'hydrodynamisme de la lagune. En effet les travaux de Plus et collaborateurs en 2009 (Plus et al., 2009) indiquent que cet hydrodynamisme est entre autres dirigé par les vents. Les passes du bassin d'Arcachon présentent de forts courants et le climat hivernal a donc pu potentiellement favoriser la remise en suspension du sédiment.

De la même manière, les concentrations en chlorophylle a ne présentent plus de niveaux supérieurs à Eyrac par rapport à Bouée 13. Les valeurs rencontrées sont désormais équivalentes entre les deux stations avec des niveaux maximaux en février 2011 (« bloom hivernal » décrit par (Glé et al., 2007)) et en octobre 2011 (période de production primaire importante dans la lagune d'après (Glé et al., 2008))

3.3.5. Analyse statistique globale des données

Les ACP réalisées en se basant sur les variables d'ASCOBAR avaient permis de mettre en évidence 3 groupes d'individus. Le premier correspondait au mois de mai 2009 et se caractérisait entre autre par de forts indices de conditions en lien avec la gamétogenèse intense en cette période de l'année. Le deuxième groupe réunissait les mois de juillet, septembre et octobre 2009, avec d'une part la période de juillet marquée par de forts indices de conditions et de fortes températures (période pré-ponte) et d'autre part la période de septembre – octobre plutôt caractérisée par les variables MTs et HAP. Le troisième groupe correspondait à la période hivernale de décembre – janvier, et se caractérisait par des longueurs de coquilles maximales, mais aussi des niveaux de contamination et de MTs élevés. Les expressions géniques étaient notamment importantes sur cette période hivernale.

De la même manière durant la **première année** de suivi OSQUAR, différents groupes peuvent être formés dans l'espace. Dans les deux organes étudiés, on peut opposer la période estivale à la période hivernale selon l'axe 1. Les individus réunis dans le groupe « Eté » sont associés aux températures les plus élevées, mais aussi aux indices de conditions les plus forts, ce qui reflète bien les processus biologiques liés à la gamétogenèse. La variable cadmium apparait également durant cette période au niveau de la glande digestive ce qui illustre bien les résultats précédemment observés (pic de contamination de cet organe en été au niveau des stations externes). Elle est néanmoins anti-corrélée à la variable chlorophylle a ce qui va à l'encontre des suppositions émises plus tôt concernant une contamination par voie trophique *via* le phytoplancton. Les résultats de bioaccumulation ne peuvent cependant pas être simplement expliqués par la présence simultanée dans le milieu de cadmium et de phytoplancton, puisque nous avons précédemment décrit le rôle majeur de la croissance des organismes dans les mesures de bioaccumulation métallique. Cette projection graphique par ailleurs n'est représentative que de 66% de la variabilité totale, et une corrélation bien qu'indicative, n'implique pas obligatoirement un lien de cause à effet entre deux paramètres. Cette observation illustre les limites d'interprétation d'une approche multivariée telle que l'ACP.

A l'opposé de ce groupe se trouve un second ensemble d'individus appartenant à la période hivernale, principalement caractérisé de façon logique par de fortes valeurs en oxygène dissous et des longueurs de coquilles maximales correspondant à la fin de la cinétique. La variable chlorophylle a est récurrente dans la formation de l'axe 1 entre les branchies et la glande digestive, et peut-être assimilée à un phénomène de floraison hivernale déjà bien décrit dans le bassin d'Arcachon (Glé et al., 2007). L'axe 1 permet donc pour les deux organes étudiés de discriminer principalement les périodes de l'année en lien avec les variations naturelles de paramètres environnementaux.

L'axe 2 en revanche, est formé en plus par les variables de contamination chimique et de métallothionéines, ce qui permet de discriminer les stations entre elles. De manière globale donc, on s'aperçoit que les sites sous influence océanique tels qu'Arguin ou Grand Banc se situent sous l'axe 1 et se caractérisent donc par de fortes croissances. A l'inverse, les stations sous influence plutôt continentale telles que le Tès ou Eyrac se situent au-dessus de l'axe 1 et présentent de fortes valeurs pour les variables de contamination et de MTs.

En dépit d'un pourcentage de variabilité totale expliquée modérée, les ACP réalisées pour l'année 1 d'OSQUAR sont cohérentes avec celles d'ASCOBAR, et résument bien le fonctionnement global de l'écosystème en illustrant à la fois la saisonnalité de certains paramètres, mais aussi l'hétérogénéité spatiale de la lagune.

Les deux ACP réalisées pour la seconde année de suivi sont très cohérentes avec les précédentes affirmations. La répartition des individus dans l'espace répond aux mêmes variables et permet de distinguer 3 groupes basés sur les différentes périodes de l'année. Les périodes les plus chaudes de l'été présentent les températures les plus importantes tandis que les périodes les plus froides du suivi présentent les concentrations en oxygène dissout, en matières en suspensions et les expressions géniques les plus élevées. Les périodes automnales et printanières se situent de manière intermédiaire entre ces deux groupes majeurs. A l'instar des observations faites pour l'année précédente, une répartition des stations dans l'espace est observable avec les stations sous influence continentales qui présentent systématiquement des valeurs supérieures de contaminations en métaux et en HAPs en opposition aux stations les plus externes de la lagune qui se caractérisent plus par les variables de croissance.

Les analyses multivariées permettent donc comme durant la seconde année d'ASCOBAR de discriminer les différentes périodes de l'année, mais également les stations les plus « continentales » des stations les plus « océaniques » ce qui était moins bien mis en évidence en 2009 – 2010.

Ce constat souligne la pertinence des analyses multivariées pour ce type d'approche in-situ, car elles présentent à la fois une bonne cohérence avec l'étude individuelle de chaque paramètre, mais également car elles résument l'information de manière visuelle et claire.

3.4. Conclusion

En dépit d'une fréquence d'échantillonnage plus espacée dans le temps, le suivi *in situ* OSQUAR mène à des conclusions similaires que le suivi ASCOBAR. En termes de performances physiologiques, la croissance des organismes d'Arguin est toujours supérieure à celle observée ailleurs dans la lagune. Ce gradient est cependant moins net qu'en 2009 du fait de variations interannuelles dans les paramètres physico-chimiques. Le faible effort de reproduction de la dernière année de suivi n'a pas permis d'identifier les épisodes de frais, probablement en lien avec la faible sensibilité de l'indicateur qui emploie les masses fraîches égouttées dans le calcul des IC. Des amaigrissements en hiver ont cependant été mis en évidence.

La contamination des organismes par les métaux suit un modèle identique à celui décrit durant ASCOBAR, avec les stations orientales plus impactées par le cuivre et le zinc dans une certaine

mesure. Le cadmium présente toujours des concentrations supérieures en été au niveau des stations les plus proches de l'océan, ce qui pourrait être associé à un apport par voie nutritive. De manière globale, les concentrations en métaux dans les organismes semblent toujours dirigées par une compétition entre la contamination, la régulation (pour les métaux essentiels) et les phénomènes de dilution pondérale. Les HAPs suivent un modèle identique à celui-ci, illustrant également le gradient croissant « externe-interne » de contamination des huîtres. Les signatures moléculaires indiquent que les organismes et le sédiment sont par ailleurs contaminés par les mêmes types de composés (poids moléculaires intermédiaire), ce qui souligne un rôle potentiel du sédiment et des particules dans la contamination des huîtres. Les variations de concentrations observées dans les huîtres ne reflètent cependant pas celles mesurées dans les sédiments. On peut donc supposer qu'une source de HAPs autre que les particules sédimentaires remises en suspension contribue à la présence de ces contaminants dans les huîtres (phytoplancton, microphytobenthos...).

De la même manière l'étude des biomarqueurs permet de retrouver des tendances observées en 2009, telles que la corrélation entre la production des métallothionéines et la présence de contaminants dans les huîtres (Cu ou HAP). Les profils transcriptomiques indiquent des tendances saisonnières similaires avec de forts niveaux hivernaux dans les glandes digestives (en lien potentiel avec des apports supérieurs de polluants du fait des fortes pluies) et des niveaux estivaux plus bas (en lien potentiel avec une interaction gamétogenèse-température-polluants). Ces tendances sont cependant moins observables dans les branchies durant la seconde année de suivi, ce qui souligne la complexité du terrain et des interactions entre paramètres abiotiques/biotiques déterminant l'intensité des expressions géniques.

Il semble ainsi que les variables les plus pertinentes pour discriminer les stations d'intérêt soit les variables de contamination chimique du *biota*. Les biomarqueurs étudiés, principalement génétiques, sont cohérents d'une année sur l'autre mais n'indiquent pas une spatialisation claire du stress supposé associé à la bioaccumulation des contaminants. Cela peut indiquer que d'autres paramètres prévalent sur la contamination chimique en ce qui concerne le déterminisme des réponses géniques. Le facteur prépondérant supposé est la gamétogenèse, qui est réputée chez l'huître pour orienter une grande partie des ressources énergétiques. Ces réflexions ont donc amené à lancer une étude spécifique dans le chapitre suivant.

4. Focus : étude des réponses liées à la reproduction et à une exposition aux HAPs durant l'été 2012

4.1. Introduction

Les travaux réalisés sur le terrain durant trois ans ont permis de mettre en évidence certains processus récurrents d'une année sur l'autre. Les expressions géniques relatives en été ont souvent montré des niveaux particulièrement bas en juillet durant la période de frai. Ces observations ont été associées à une interaction entre les effets biologiques de la reproduction (allocation énergétique préférentielle), de fortes températures et les effets potentiels de la contamination du milieu (en lien avec une activité nautique supérieure). Ces études n'ont ainsi pas permis de conclure sur l'effet de la contamination estivale seule.

Ce « focus » constitue donc une approche complémentaire dont l'objectif est de différencier les effets de la reproduction de ceux de la contamination. Le même protocole que pour les études de terrain précédentes a été employé concernant la mise en place du « caging ». Les prélèvements n'ont cependant eu lieu que de juin à septembre 2012 à une fréquence mensuelle, et deux types différents d'huîtres ont été utilisés : l'huître creuse diploïde présentant une gamétogenèse marquée durant la période printemps/été, et l'huître creuse triploïde réputée pour présenter un effort de reproduction limité (Nell, 2002). Les animaux étaient âgés de 18 mois lors de leur mise en place en mai 2012 et sont tous originaires du bassin d'Arcachon (Grand Banc).

En se basant sur les travaux réalisés précédemment, trois sites ont été choisis pour réaliser cette étude : la station Ar dont la contamination en HAPs est globalement très faible, et les stations Ile aux oiseaux et Le Tès plus orientales dont la contamination est plus importante. Le site Ile aux oiseaux est particulièrement connu pour le tourisme important dont il fait l'objet en été (Le Berre et al., 2010) et Le Tès se caractérise par sa proximité avec le port d'Arcachon. Seuls les HAPs ont été étudiés durant ces travaux, car ces composés sont emblématiques de la contamination par les carburants et sont donc potentiellement les plus représentatifs d'un effet lié aux activités nautiques.

Les techniques employées sont décrites dans la partie « Eléments méthodologiques » et ne seront pas rappelées ici. Les résultats exposés et discutés concernent : (1) les paramètres de croissance (masse corps mou, longueur de coquille, indices de condition) ; (2) la maturité sexuelle ; (3) les concentrations en métallothionéines ; (4) les expressions géniques relatives de 10 gènes de stress ; (5) les concentrations en HAPs dans les huîtres, l'eau, le sédiment et le microphytobenthos.

4.2. Résultats

4.2.1. La croissance et reproduction

Les valeurs présentées sont des moyennes \pm écarts-types ($n=5$). Les lettres minuscules indiquent l'effet « temps » au niveau de chaque site. Les symboles # et § permettent de discriminer l'effet « Site » pour chaque ploïdie, et l'indication * permet de statuer sur la différence entre les deux modèles pour chaque station (Kruskal-Wallis puis Conover-Iman ; $p < 0,05$; XLSTAT 2013).

La Figure 76 présente l'évolution de la **masse des corps mous** des huîtres étudiées. De manière globale, on observe chez les diploïdes comme chez les triploïdes un effet du site très important. Les huîtres transplantées à Arguin et Ile aux oiseaux croissent de manière équivalente (#) et présentent des masses fraîches supérieures aux huîtres de Le Tès (§). Les huîtres triploïdes sont cependant systématiquement plus grosses que les diploïdes pour chaque station (*).

Concernant les variations saisonnières chez les diploïdes, les stations Arguin et Ile aux oiseaux atteignent leur masse maximale en septembre 2012 ($T_0 : 2,4 \pm 1,2$ g ; Ar : $7,5 \pm 2,0$ g ; Io : $6,6 \pm 0,9$ g). Cette valeur est atteinte en juillet 2012 pour Le Tès ($5,6 \pm 0,6$ g). Les huîtres triploïdes présentent également des valeurs élevées en fin de cinétique avec un maximum atteint en août 2012 pour Arguin et Le Tès (Ar : $8,2 \pm 1,4$ g ; Lt : $6,9 \pm 1,1$ g) et en septembre 2012 pour Ile aux oiseaux ($9,1 \pm 0,7$ g).

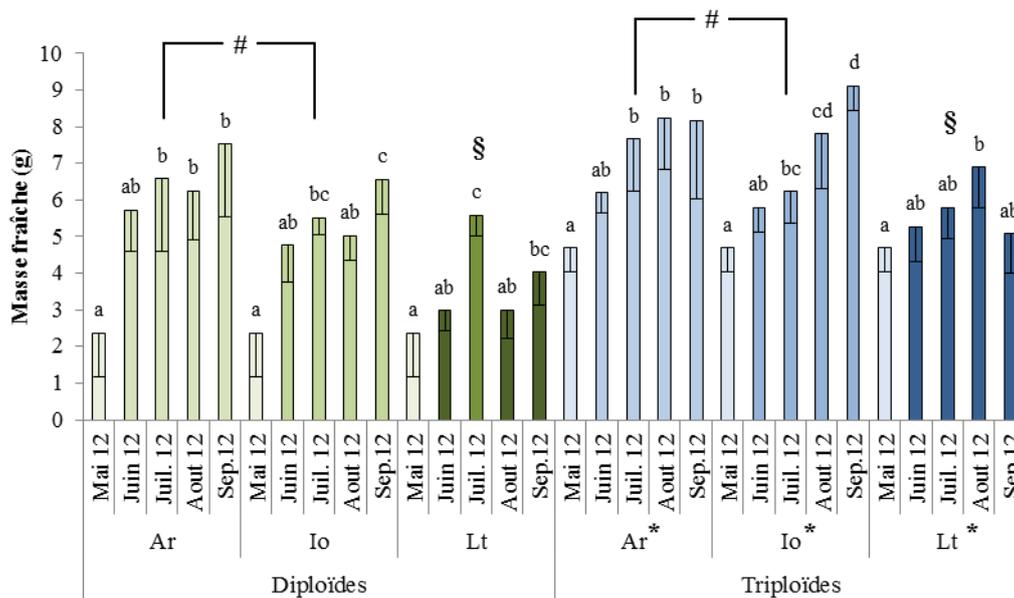


Figure 76 : Evolution de la masse du corps mou des huîtres diploïdes et triploïdes transplantées durant l'été 2012

Les **longueurs de coquilles** (Figure 77) indiquent que les huîtres diploïdes ne présentent aucune différence entre les stations étudiées, à l'inverse des triploïdes pour lesquelles Arguin et Ile aux oiseaux présentent des longueurs équivalentes et supérieures à Le Tès. La longueur des coquilles des triploïdes à Arguin est supérieure à celle des diploïdes. Concernant les variations saisonnières, aucune évolution n'apparaît au Tès ni chez les diploïdes ni chez les triploïdes. Les coquilles de Ile aux oiseaux augmentent significativement en longueur chez les deux modèles et atteignent leur maximum en septembre 2012 (Diploïdes : 10 ± 1 cm ; Triploïdes : 9 ± 1 cm). Seules les coquilles des triploïdes augmentent significativement à Arguin ($10,2 \pm 0,6$ cm).

Les **indices de conditions** (Figure 78) présentent une différence entre les trois stations avec des niveaux minimaux chez les deux modèles au Tès. Les IC des diploïdes à Arguin sont supérieurs à ceux des triploïdes. Les variations saisonnières chez les diploïdes sont significatives à Ile aux oiseaux et Le Tès avec un pic en juillet 2012 (Io : $23,1 \pm 6,6$; Lt : $22,7 \pm 3,01$). Les triploïdes présentent des tendances moins marquées avec un pic en juillet à Arguin ($16,9 \pm 3,5$) et une absence de variation à Le Tès. L'amplitude de variation chez les triploïdes est faible, aucun phénomène de « pic » n'est observable.

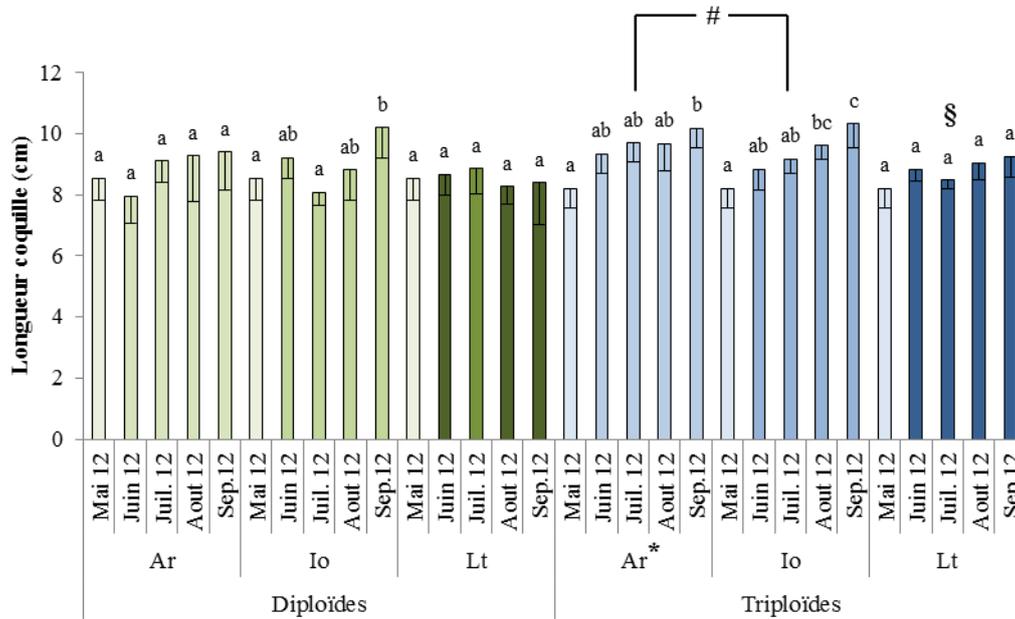


Figure 77 : Evolution des longueurs des coquilles des huîtres diploïdes et triploïdes transplantées durant l'été 2012

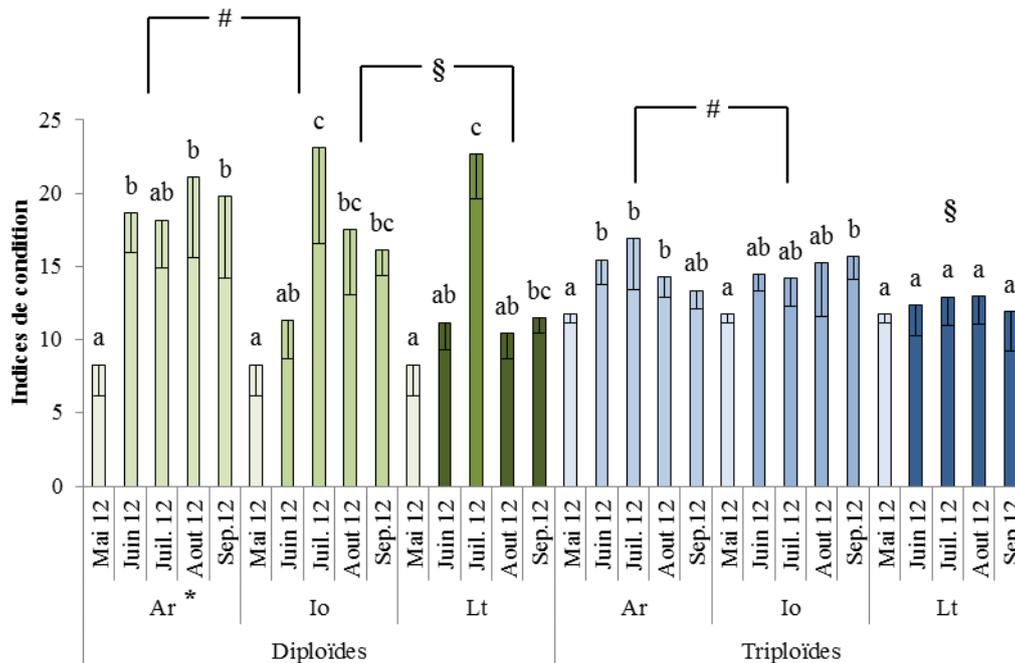


Figure 78 : Evolution des indices de condition des huîtres diploïdes et triploïdes transplantées durant l'été 2012

L'étude des **stades de reproduction** a finalement été réalisée par observation macroscopique de l'état de développement de la gonade. La Figure 79 résume les observations pour chaque site, modèle

biologique et temps de prélèvement réalisées systématiquement sur 5 individus (ceux employés pour les analyses de MTs et génétiques). A est un stade caractérisé par l'absence de gonade. B correspond à une glande digestive partiellement couverte par la gonade, B+ à une glande digestive entièrement recouverte, et enfin C à un stade totalement mature.

L'observation la plus frappante est l'absence totale de stades C chez les triploïdes, qui atteignent seulement le stade B+. Cette observation est principalement réalisée à Ile aux oiseaux et Le Tès à partir du mois d'août 2012. En revanche, les diploïdes présentent une totalité de stades C pour les trois stations dès le mois de juin jusqu'en juillet 2012. Cette maturité maximale perdure à Arguin jusqu'en septembre. Ile aux oiseaux et Le Tès présentent une minorité de stades C à partir d'août. Une reprise de la gamétogenèse semble apparaître au niveau de ces deux stations cependant, comme l'indique l'augmentation des stades C à Ile aux oiseaux en septembre, et la réapparition des stades B+ au Tès à la même période.

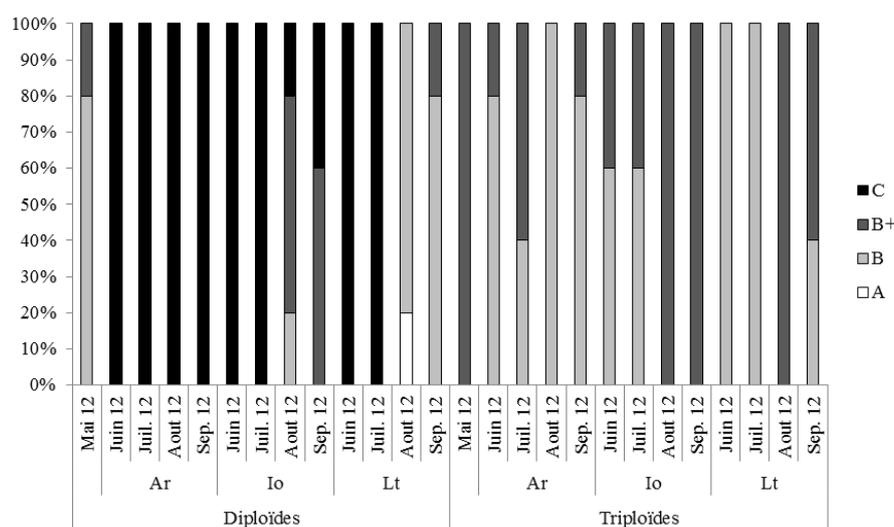


Figure 79 : Observation macroscopique de la maturité sexuelle des huîtres transplantées en été 2012.

4.2.2. Les Hydrocarbure Aromatiques Polycycliques (HAPs)

4.2.2.1. Dans les huîtres

La Figure 80 présente les concentrations pour les 16 HAPs prioritaires de l'US EPA dans les huîtres prélevées durant l'été 2012. Aucune variabilité n'a pu être affichée puisque ces valeurs ont été obtenues à partir du regroupement de 20 individus. Des tests de Kruskal-Wallis suivis de tests *a posteriori* de Conover-Iman ($p < 0,05$) ont par ailleurs permis d'identifier un effet site chez les diploïdes comme chez les triploïdes : les concentrations obtenues à Arguin sont significativement inférieures à celles obtenues à Ile aux oiseaux et à Le Tès pour les deux modèles.

Les valeurs de mai 2012 (T_0 avant mise en place sur le terrain) indiquent des niveaux de base différents pour des individus du même âge ($2n$: 93,8 ng/g, ps ; $3n$: 155,4 ng/g, ps). Un équilibre est atteint dès un mois d'exposition sur site pour les diploïdes comme les triploïdes avec des variations inter-mensuelles très faibles.

Les diploïdes présentent des concentrations à Arguin comprises entre 38,4 ng/g, ps en juillet et 87,4 ng/g, ps en septembre. Les concentrations mesurées à Ile aux oiseaux et Le Tès sont très similaires et

oscillent entre 159,2 et 198,1 ng/g, ps à Ile aux oiseaux pour les mêmes dates et entre 165,5 et 192,2 ng/g, ps à Le Tès. Les huîtres triplôides présentent des niveaux de contaminations supérieurs à Ile aux oiseaux et Le Tès par rapport aux diploïdes, mais équivalents voire inférieurs à Arguin. Les valeurs à Arguin vont de 49,1 ng/g, ps en septembre à 67,3 ng/g, ps en août. Les concentrations à Ile aux oiseaux et Le Tès sont minimales en juillet (Io : 170,2 ng/g, ps ; Lt : 185,7 ng/g, ps) et maximales en août pour Ile aux oiseaux (238,1 ng/g, ps) et en juin pour Le Tès (246,1 ng/g, ps). L'effet du temps n'a pu être testé pour chaque site. On observe cependant, hormis pour les diploïdes à Arguin, que les valeurs les plus faibles sont obtenues en juillet.

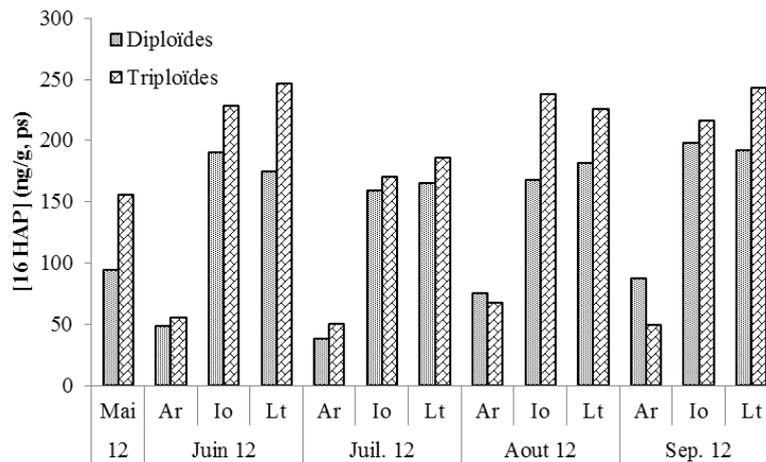


Figure 80 : Concentrations des 16 HAPs prioritaires dans les huîtres échantillonnées en été 2012

4.2.2.2. Dans les sédiments

Les mêmes analyses statistiques que celles réalisées précédemment pour les huîtres ont été appliquées aux concentrations en HAPs dans les sédiments. La Figure 81 présente les concentrations pour les 16 HAPs prioritaires au niveau des matrices sédimentaires, et les analyses statistiques ont permis de regrouper Arguin et Ile aux oiseaux qui présentent des valeurs significativement plus faibles qu'à Le Tès. Les valeurs oscillent à Arguin entre 0,3 ng/g, ps en juillet et 192,3 ng/g, ps en septembre ; elles varient à Ile aux oiseaux entre 16,2 ng/g, ps en septembre et 323,4 ng/g, ps en août ; les variations à Le Tès sont comprises entre 368,4 ng/g, ps en juillet et 1828 ng/g, ps en septembre.

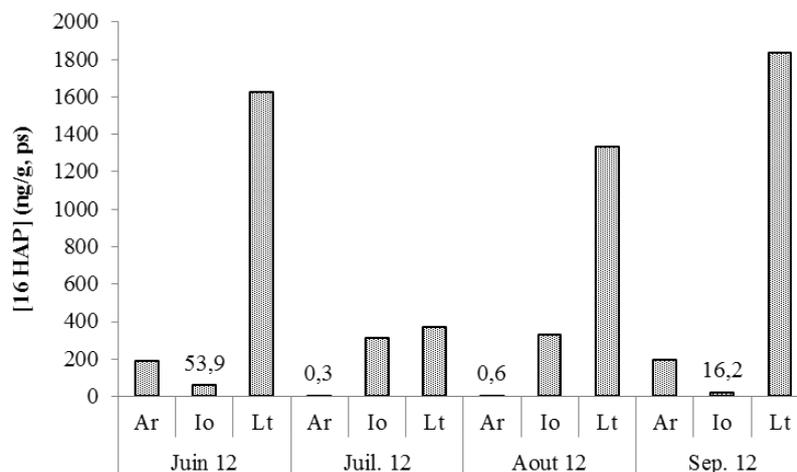


Figure 81 : Concentrations des 16 HAPs prioritaires dans les sédiments échantillonnés en été 2012

4.2.2.3. Dans l'eau

Les concentrations des 16 HAPs prioritaires sont présentées dans la Figure 82. Aucun effet site net n'a pu être extrait des concentrations en 16 HAPs dans l'eau. Les valeurs sont comprises entre 2 et 7 ng/L. Les concentrations vont de 2,1 à 4,6 ng/L à Arguin en août et septembre. Elles sont comprises entre 3,6 ng/L en juin et 7,1 ng/L en juillet à Ile aux oiseaux ; entre 3,6 ng/L en juillet et 5,8 ng/L en juin à Le Tès. En dépit du fait qu'aucune tendance ne puisse être extraite statistiquement du fait du faible nombre d'échantillons, on observe tout de même que les sites d'Ile aux oiseaux et Le Tès atteignent des valeurs maximales nettement supérieures à celles obtenues à Arguin.

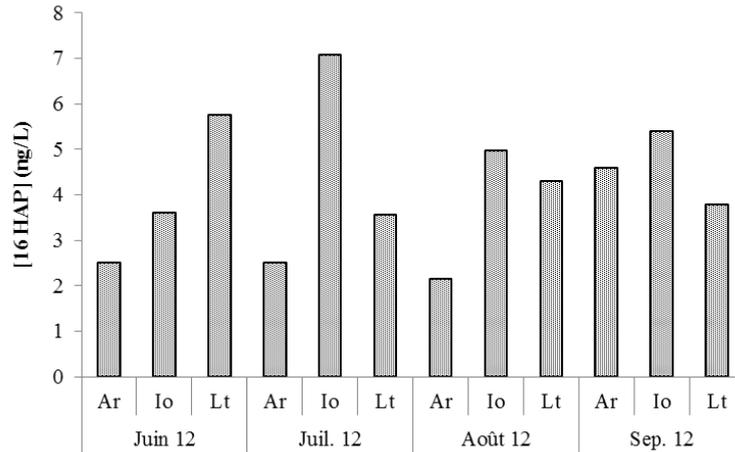


Figure 82 : Concentrations des 16 HAPs prioritaires dans l'eau échantillonnée en été 2012

4.2.2.4. Dans le microphytobenthos

Les concentrations en 16 HAPs prioritaires mesurées dans le microphytobenthos sont présentées dans la Figure 83. Bien que les lames de verre collectrices aient été disposées au niveau de toutes les stations du programme OSQUAR (sauf Eyrac), les résultats seront présentés dans cette section. En effet, ces lames ont été mises en place en fin de cinétique et permettent de cerner entre autre la contamination estivale de ce compartiment.

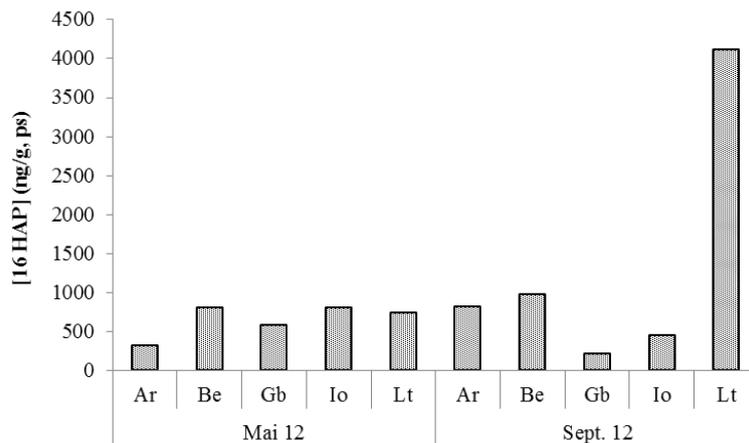


Figure 83 : Concentrations des 16 HAPs prioritaires dans le microphytobenthos échantillonné en 2012

Les valeurs de septembre 2012 correspondent à une colonisation de 2 mois après disposition des lames sur site en juillet et les valeurs de mai 2012 à une colonisation de 4 mois après disposition des lames

sur site en janvier. En mai 2012, les concentrations mesurées sont comprises entre 311,3 ng/g, ps à Arguin et 800,5 ng/g, ps à Bélisaire. Les stations Ile aux oiseaux et Le Tès se rapprochent des valeurs obtenues à Bélisaire, tandis que les valeurs de Grand Banc se rapprochent de celles d'Arguin. En septembre, les valeurs sont comprises entre 203 ng/g, ps à Grand Banc et 4099,5 ng/g, ps à Le Tès. Arguin et Bélisaire présentent des concentrations élevées en comparaison à Grand Banc (804,8 et 966,2 ng/g, ps) tandis qu'Ile aux oiseaux présente des concentrations intermédiaires (438,1 ng/g, ps).

4.2.3. La production de métallothionéines

Les données de MTs ont été traitées de la même manière que les variables de croissances (Kruskal Wallis puis Conover-Iman, $p < 0,05$; XLSTAT 2013).

La Figure 84 présente les **concentrations en MTs mesurées dans les branchies** (moyennes \pm ET ; $n=5$) des organismes prélevés en été 2012. Pour chaque station, aucune différence entre les deux modèles n'a pu être mise en évidence. Les triploïdes ne présentent par ailleurs aucune différence entre les 3 stations d'intérêt, tandis que les diploïdes présentent des niveaux maximaux à Ile aux oiseaux, légèrement plus faibles à Arguin, et minimaux à Le Tès.

Les variations saisonnières sont communes aux deux modèles d'intérêt : une augmentation jusqu'en juillet 2012 est suivie de chutes en août, avant une reprise de production plus ou moins significative en fonction de la station considérée. Ces variations sont particulièrement marquées pour les diploïdes d'Ile aux oiseaux ($21,7 \pm 8,3$ nmol Hg/g, pf en juillet et $3,3 \pm 1$ nmol Hg/g, pf en août) de Le Tès (de $18,6 \pm 12$ nmol Hg/g, pf à $2,3 \pm 1,6$ nmol Hg/g, pf) et pour les triploïdes d'Arguin (de $20,8 \pm 2,4$ nmol Hg/g, pf à $3,5 \pm 2,5$ nmol Hg/g, pf) et de Ile aux oiseaux (de $17,7 \pm 4,4$ nmol Hg/g, pf à $3,4 \pm 2,8$ nmol Hg/g, pf).

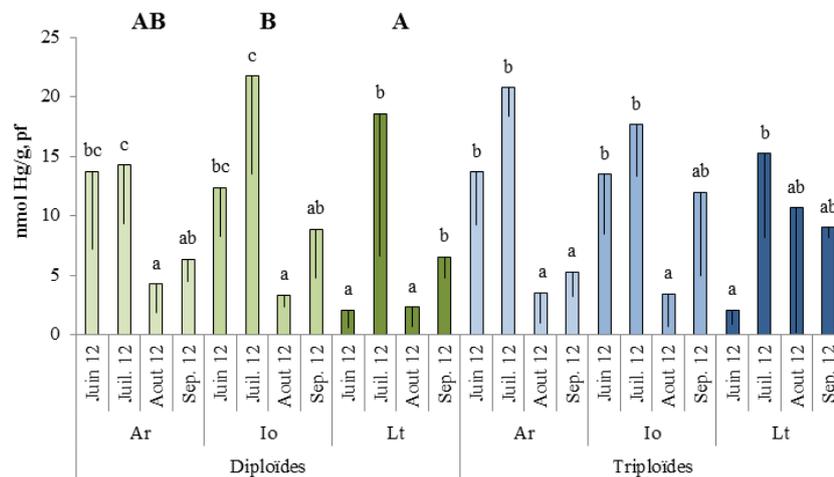


Figure 84 : Evolution des concentrations en MTs mesurées dans les branchies des huîtres transplantées en été 2012.

La Figure 85 présente les mêmes types de résultats mais dans les **glandes digestives** des organismes étudiés. De la même manière, aucune différence entre diploïdes et triploïdes n'a été mise en évidence par l'outil statistique. Comme pour les branchies, aucune différence entre les trois stations n'a été mise

en évidence chez le modèle triploïde. Les diploïdes en revanche présentent des concentrations supérieures à Arguin en comparaison de Le Tès.

Les variations saisonnières sont similaires dans cet organes à celles observées dans les branchies, avec des valeurs maximales en juillet (sauf pour les triploïdes d'Ar) suivies de chûtes importantes. Chez les diploïdes, ce phénomène est observable au niveau de toutes les stations (Ar : $64,2 \pm 14,6$ nmol Hg/g, pf à $31,3 \pm 8,2$ nmol Hg/g, pf ; Io : $62,7 \pm 18,9$ nmol Hg/g, pf à $19 \pm 4,9$ nmol Hg/g, pf ; Lt : $48,6 \pm 5,5$ nmol Hg/g, pf à $19,9 \pm 10,7$ nmol Hg/g, pf) mais seulement au niveau de Arguin et Ile aux oiseaux chez les triploïdes (Ar : $43,1 \pm 10,5$ nmol Hg/g, pf à $22,5 \pm 7,8$ nmol Hg/g, pf ; Io : $42,2 \pm 7,8$ nmol Hg/g, pf à $24,1 \pm 4,1$ nmol Hg/g, pf).

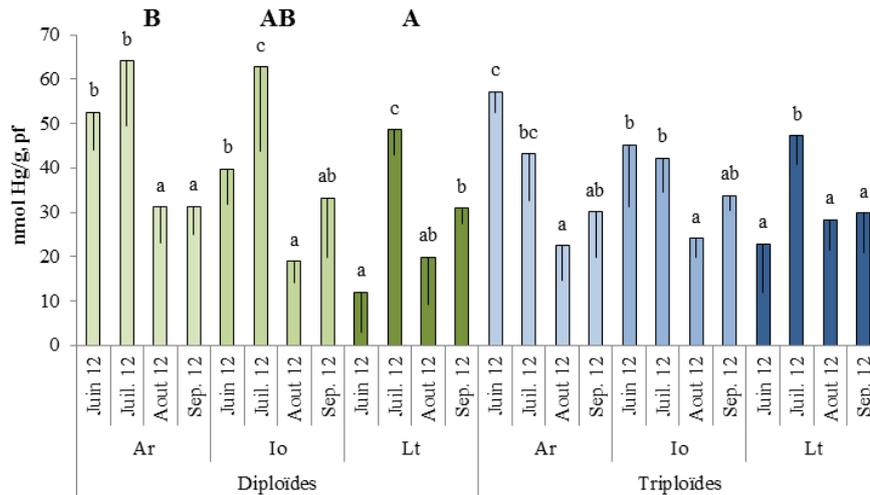


Figure 85 : Evolution des concentrations en MTs mesurées dans les glandes digestives des huîtres transplantées en été 2012.

4.2.4. Les expressions géniques relatives

La Figure 86 présente les variations des expressions géniques relatives des 10 gènes de stress étudiés dans les **branchies** des huîtres diploïdes et triploïdes durant l'été 2012 (moyennes \pm ES ; $n=5$). Des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis ($p<0,05$) suivis de tests a posteriori de Conover-Iman (XLSTAT) ont permis d'identifier l'effet du « temps » pour chaque site et modèle (lettres minuscules). De la même manière l'effet « Site » a été étudié pour chaque type d'huître en confondant tous les temps de prélèvements (lettres majuscules). Des comparaisons de Mann-Whitney ($p<0,05$) ont enfin permis d'identifier l'effet « Ploidie » au niveau de chaque site lorsqu'il existe (symbole * situé au niveau du site présentant les valeurs les plus fortes).

En ce qui concerne les **huîtres diploïdes**, l'effet site est peu visible : *cat* est plus exprimé à Ile aux oiseaux et Le Tès ; *coxI* est plus exprimé à Arguin par rapport à Ile aux oiseaux ; *sodmt* est plus exprimé à Ile aux oiseaux qu'à Arguin. En termes de saisonnalité, deux gènes présentent des variations d'expression dans le temps à Arguin, avec des pics en septembre : *gst* ($0,54 \pm 0,24$) et *sodmt* ($0,27 \pm 0,05$). Les sites Ile aux oiseaux et Le Tès se caractérisent en revanche par des pics en juin pour *gpx* (Io : $1,77 \pm 1,13$; Lt : $1,02 \pm 0,25$), *mxr* (Io : $0,69 \pm 0,24$; Lt : $0,68 \pm 0,21$), *cat* (Lt : $0,62 \pm 0,22$) et

sodmt ($0,76 \pm 0,25$). Concernant les **huîtres triploïdes**, un effet site est observable pour les gènes *gpx*, *gst*, *sod*, *cyp1a1* et *mt2* qui présentent des expressions maximales à Ile aux oiseaux. Les variations saisonnières à Arguin sont caractérisées par des niveaux supérieurs en septembre pour *gpx* ($0,48 \pm 0,03$), *mxr* ($0,26 \pm 0,08$), *mt1* ($1,94 \pm 0,6$), *mt2* ($2,42 \pm 0,79$). Seul un gène présente des différences d'expression durant l'été au Tès : *mxr* en juin ($1,76 \pm 0,74$). Enfin la station Ile aux oiseaux présente des niveaux transcriptomiques significativement plus élevés en juillet pour les gènes *gst* ($1,89 \pm 0,69$), *mxr* ($2,01 \pm 0,64$), *sod* ($2,54 \pm 1,04$), *cyp1a1* ($3,78 \pm 1,54$). Les expressions géniques relatives de *sod* et *coxI* sont par ailleurs supérieures chez les triploïdes par rapport aux diploïdes au niveau du site Ile aux oiseaux.

La Figure 87 présente les mêmes types de résultats pour les **glandes digestives**. On y observe un effet site marqué pour les **huîtres diploïdes** avec une dominance de Le Tès concernant l'expression des gènes *gpx*, *gst*, *sod*, *cat* et *cyp1a1*. Le gène *cyp1a1* est par ailleurs exprimé de façon équivalente à Arguin. En termes de saisonnalité, la station Arguin se caractérise par des surexpressions en septembre pour les gènes *gst* ($1,42 \pm 0,54$) et *cat* ($0,36 \pm 0,24$). Les stations Ile aux oiseaux et Le Tès en revanche se caractérisent par des surexpressions au mois de juin pour les gènes *gpx* (Io : $0,35 \pm 0,06$; Lt : $1,31 \pm 0,4$), *mxr* (Io : $0,12 \pm 0,04$; Lt : $0,51 \pm 0,17$), *sod* (Lt : $1,65 \pm 0,39$) et *sodmt* (Lt : $2,32 \pm 0,46$). Les **huîtres triploïdes** présentent des niveaux supérieurs d'expression pour le gène *gpx* au Tès. Cette station exprime également de façon importante les gènes *mxr* et *cat*. Le gène *cyp1a1* est cependant plus exprimé à Arguin. Les triploïdes prélevées à Arguin présentent par ailleurs des niveaux transcriptomiques supérieurs pour les gènes *coxI* en juillet ($48,5 \pm 10,2$) et pour *mt2* en août ($36,5 \pm 29$). Le site Ile aux oiseaux se distingue par des niveaux d'expression élevés en septembre pour *gpx* ($0,18 \pm 0,02$), en juillet pour *mxr* ($0,096 \pm 0,090$) et en juin et septembre pour *coxI* (juin : $57,9 \pm 15,4$; septembre : $46,7 \pm 4,6$). Enfin la station du Tès présente des niveaux élevés d'expression en juin pour les gènes *mxr* ($0,53 \pm 0,30$), *cat* ($0,62 \pm 0,17$), *cyp1a1* ($0,75 \pm 0,13$) et *sodmt* ($0,76 \pm 0,21$). Les expressions géniques relatives de *mxr* et *cat* sont par ailleurs supérieures chez les diploïdes à Ile aux oiseaux, tandis qu'elles sont supérieures chez les triploïdes pour *coxI*. Le gène *cyp1a1* est également plus exprimé chez les diploïdes au niveau du Tès.

De façon générale : Peu de différences entre diploïdes et triploïdes apparaissent en comparant chaque site sur l'ensemble de la cinétique. L'effet site est plus marqué chez les diploïdes au niveau de la glande digestive, et souligne de fortes expressions au Tès. Les niveaux d'expression les plus élevés sont observés en septembre pour Arguin, et en juin pour Ile aux oiseaux et Le Tès dans les deux organes étudiés. Pour les triploïdes, les stations Ile aux oiseaux et Le Tès se distinguent par de forts niveaux d'expression respectivement dans les branchies et la glande digestive. Le site Ile aux oiseaux se distingue par des niveaux transcriptomiques élevés en juillet (surtout dans les branchies). Le Tès se distingue en juin et Arguin en septembre dans les branchies. Les tendances sont moins nettes que chez les diploïdes dans la glande digestive.

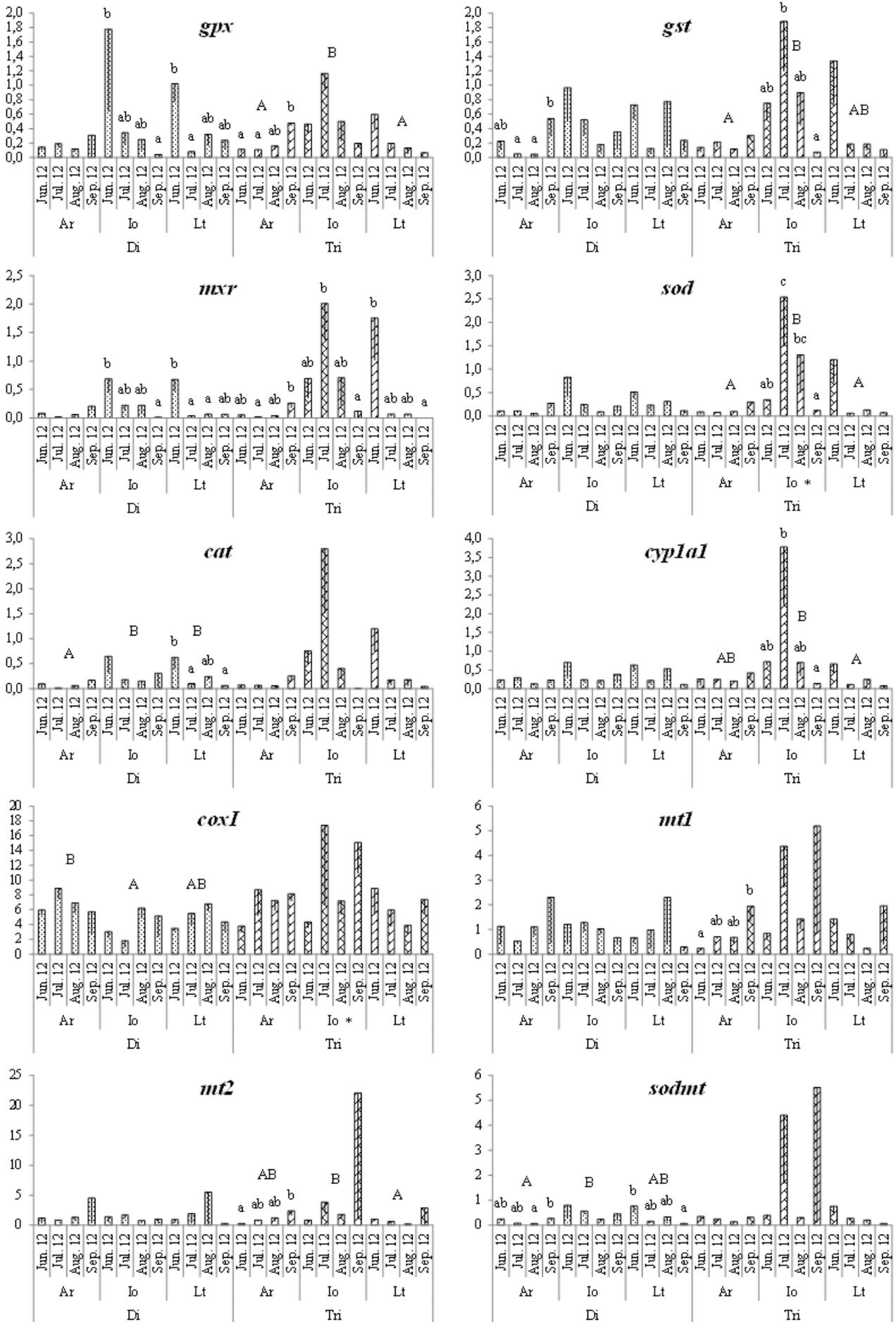


Figure 86 : Expressions géniques relatives des 10 gènes de stress étudiés dans les branchies des huîtres transplantées en été 2012.

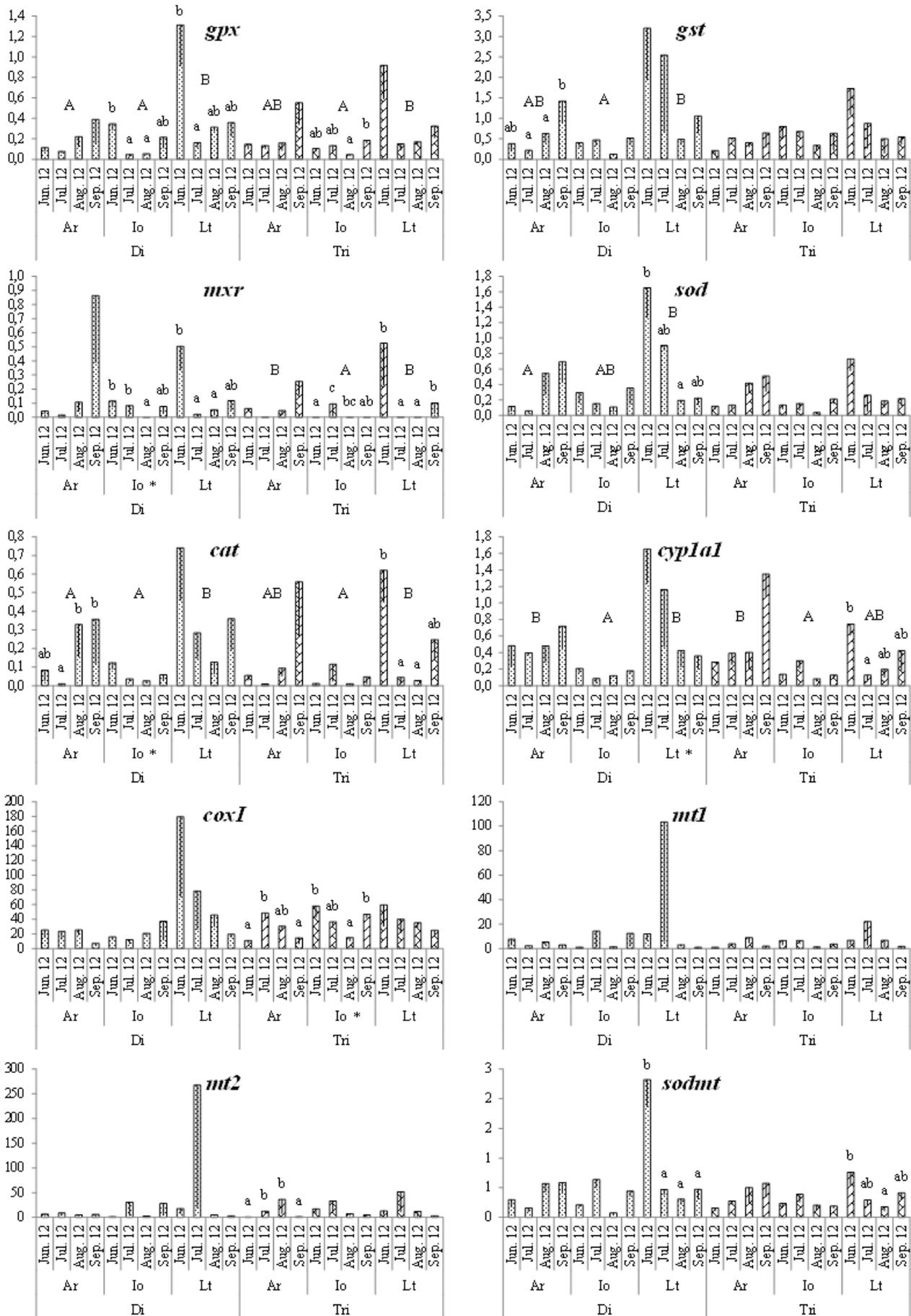


Figure 87 : Expressions géniques relatives des 10 gènes de stress étudiés dans les glandes digestives des huîtres transplantées en été 2012.

4.2.5. Les dommages à l'ADN

Les données de dommages à l'ADN fournies par un des partenaires du projet ont été obtenues par le test comète. Le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète est donc représenté pour chaque site, modèle et temps de prélèvement dans la Figure 88 (moyennes \pm ET ; n=5). Les lettres indiquent les différences entre chaque barre de l'histogramme, et ont été obtenues par ANOVA 3 facteurs (site * temps * ploïdie).

Globalement, peu de variations sont observables au cours de cette étude. On notera entre autre une absence d'évolutions significatives chez les triploïdes, hormis quelques légères hausses en juin à Le Tès ($7,93 \pm 3,28$ %) et à Ile aux oiseaux en juillet ($9,51 \pm 3,45$ %). Les diploïdes en revanche montrent des tendances bien plus marquées, notamment au niveau d'Ile aux oiseaux en juin ($15,38 \pm 6,04$ %) qui est la seule valeur significativement supérieure aux autres. Des valeurs légèrement plus fortes sont également observables à Le Tès en juin ($9,87 \pm 3,59$ %).

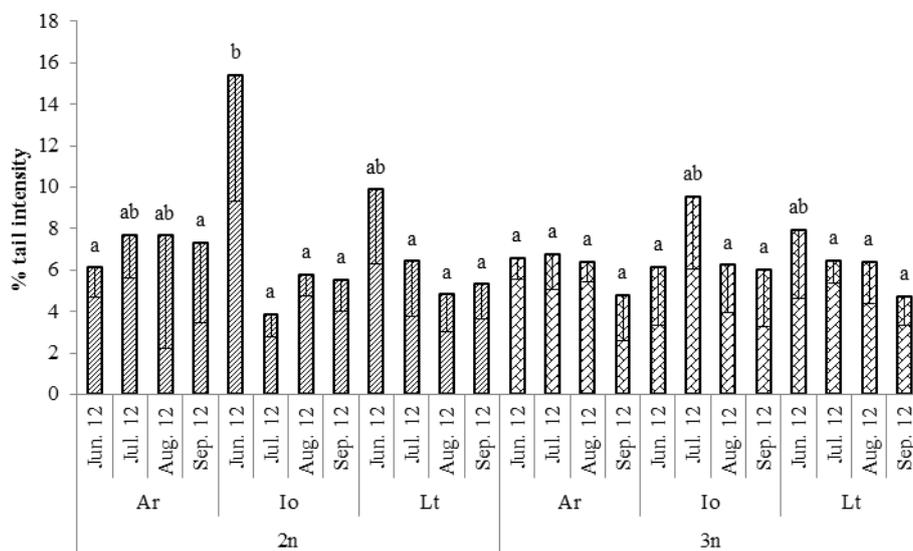


Figure 88 : Evolution des cassures à l'ADN mesurées par le test comète en été 2012.

4.3. Discussion

4.3.1. La croissance et la reproduction des huîtres transplantées

Les variables de croissance présentent des résultats cohérents avec nos attentes. Les animaux transplantés en début de cinétique avaient le même âge, cependant les triploïdes présentaient déjà des masses de corps mous supérieures aux diploïdes. Cette tendance a perduré durant la totalité de la cinétique, ce qui explique que les triploïdes soient significativement plus grosses. Cet état de fait est largement décrit dans la littérature et peut être mis en lien avec une allocation d'énergie préférentielle à la croissance de la part des triploïdes (Gouletquer et al., 1996; Nell, 2002). L'étude des longueurs de coquilles confirme cette hypothèse puisque les huîtres triploïdes d'Arguin présentent des tailles significativement supérieures.

Les stades de développement sexuel indiquent bien par ailleurs que les triploïdes n'atteignent jamais la maturité durant cette étude. Cela souligne bien un investissement d'énergie inférieur dans les

processus liés à la reproduction. La stérilité partielle de ces animaux est également bien connue, et représente une des raisons principales de leur exploitation en ostréiculture.

Les indices de conditions inférieurs des triploïdes à Arguin et leur faible amplitude de variation confirment un développement moins important de la gonade puisque cet indice rend compte du niveau de « remplissage » de la coquille. Les valeurs demeurent en revanche élevées et « stables » pour les diploïdes à cette station, ce qui peut être associé à une production importante de gamètes ; aucun épisode de frai n'est cependant détecté au travers des IC, ce qui est cohérent avec les résultats rapportés par l'IFREMER en 2012 (Perrière-Rumèbe, 2012). Les diminutions drastiques et tardives d'IC chez les diploïdes de Ile aux oiseaux et du Tès sont également cohérentes avec ces résultats et indiquent des pertes de masses liées aux émissions gamétiques.

4.3.2. La contamination en HAPs

Différents compartiments ont été étudiés pour cette étude complémentaire. La contamination des huîtres dans un premier lieu présente des points communs avec les études menées précédemment sur le terrain. Un gradient de contamination apparaît de façon marquée pour les diploïdes comme les triploïdes, avec des niveaux faibles à Arguin et des niveaux élevés sur les stations les plus internes d'Ile aux oiseaux et Le Tès. De précédentes études ont déjà démontré une hétérogénéité des masses d'eau au sein de la lagune. Les eaux internes se renouvellent plus lentement que les eaux proches des passes (Plus et al., 2009) ce qui peut expliquer en partie la contamination supérieure des huîtres situées au cœur du bassin.

Les concentrations mesurées dans le sédiment indiquent notamment que la station du Tès est particulièrement impactée. La proximité du port d'Arcachon peut être à l'origine d'apports supérieurs. De plus, la capacité de rétention des HAPs par le sédiment est augmentée par les teneurs en matière organique élevée mesurées au Tès. Un transfert de contaminants du sédiment vers les huîtres ne peut être exclu en cas de remise en suspension. Ces processus sont communs et bien connus chez les organismes filtreurs (Baumard et al., 1998a, 1998b).

Les lames de verre disposées au niveau de chaque site de l'étude ont par ailleurs permis de récolter du microphytobenthos. Certaines diatomées de ce compartiment *a priori* sédimentaire (Macintyp et Miller, 1996) peuvent cependant en cas de remise en suspension du sédiment coloniser ces lames. Le « biofilm » récolté sur ces dispositifs peut ainsi se rapprocher qualitativement d'une partie du compartiment nutritif des huîtres. Les résultats observés en septembre indiquent que ce compartiment est significativement contaminé par les HAPs, notamment au Tès où 4 µg/g, ps sont atteints. Ces mesures ayant été réalisées après trois mois de colonisation en été, on peut présumer au regard des valeurs de mai que les activités nautiques du port ont contribué à la pollution de ce compartiment.

On constate par ailleurs de manière intéressante que le compartiment dissous à l'inverse des matrices solides, présente une faible hétérogénéité inter-stations. Les niveaux sont globalement très bas (<10 ng/L) et en accord avec les précédents travaux réalisés (Crespo, 2009). Le mélange est principalement constitué de composés légers tels que le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène. Ces deux derniers composés font partie des hydrocarbures les plus représentés dans les huîtres, ce qui indique un rôle

probable du compartiment dissout dans la contamination des organismes filtreurs en dépit de niveaux très faibles mesurés (forte chronicité). Ces deux composés ainsi que le BbF sont par ailleurs très présents dans le microphytobenthos ce qui confirme également le rôle du compartiment nutritif dans la contamination des huîtres. Les propriétés chimiques de ces composés (Kim et al., 2013) favorisent de plus leur adsorption sur les matières en suspension.

Le lien entre la contamination des huîtres d'Ile aux oiseaux et celle des différents compartiments à cette station est cependant difficile à établir. Il est possible que d'autres compartiments aient joué un rôle dans cette contamination (phytoplancton, matières en suspension en général...). De plus, les mesures réalisées demeurent des prélèvements ponctuels mensuels et ne peuvent rendre compte d'une contamination diffuse variable. Le site d'Ile aux oiseaux est cependant réputé pour la forte affluence touristique dont il fait l'objet en été (Le Berre et al., 2010). Cet état de fait couplé à une rétention supérieure des eaux peut être à l'origine des résultats de bioaccumulation observés.

4.3.3. Le suivi des biomarqueurs

4.3.3.1. Les métallothionéines

Ces petites protéines cytosoliques sont particulièrement connues pour leur capacité à séquestrer les métaux (Capdevila et al., 2012). Leur induction n'est cependant pas uniquement tributaire de la contamination métallique ce qui rend leur rôle comme biomarqueurs de ce type de pollution sujet à controverse (Ruttikay-Nedecky et al., 2013). Des signaux hormonaux en lien avec la reproduction peuvent entre autre induire la production de ces protéines. Ce type de variations saisonnières a déjà été mis en évidence pour *Corbicula fluminea* (Baudrimont et al., 2003). Nos données sont en accord avec ce postulat, puisque dans les branchies comme la glande digestive, de fortes hausses sont mesurées en juillet, suivies de chutes drastiques des valeurs comme déjà observé auparavant (Meistertzheim et al., 2009). Ce mécanisme décrit dans la littérature (Mao et al., 2012) pour *C. gigas* peut être lié à un transfert de la protéine dans les gamètes afin de soutenir le développement du futur embryon.

Nos résultats n'indiquent cependant aucune différence concernant la production de cette protéine entre les huîtres diploïdes et triploïdes, en dépit d'un effort de reproduction inférieur de la part de ces dernières. Cela a déjà été observé auparavant chez des organismes exposés à des métaux (Marie et al., 2006b). Les triploïdes ne présentent par ailleurs aucune différence entre les trois stations étudiées contrairement aux diploïdes qui indiquent des niveaux supérieurs à Arguin et Ile aux oiseaux.

En dépit du fait que les précédents travaux sur le terrain aient déjà mis en évidence une corrélation « HAPs – MTs » potentiellement due au stress oxydant, cette étude ne semble pas corrélérer ces deux paramètres. Il semble que la production de ces protéines durant la période estivale soit majoritairement contrôlée par des processus biologiques en lien avec la reproduction. Les chutes des concentrations en MTs au niveau des trois sites étudiés en juillet, sont potentiellement à mettre en lien avec les émissions gamétiques. Bien que généralement de faible envergure, ces processus ont également pu se produire chez les triploïdes comme en atteste la littérature (Nell, 2002). La diminution progressive des valeurs d'IC pour ce modèle corrobore cette hypothèse, comme certains éléments de la littérature (Normand et al., 2008).

4.3.3.2. Les expressions géniques relatives et les dommages à l'ADN

A l'instar des études réalisées sur le terrain de 2009 à 2012 (Approche *in situ* : 2.2.5 et 3.2.5), une variabilité importante des niveaux transcriptomiques est observable. De manière globale, les différences entre diploïdes et triploïdes sont faibles. Certaines **tendances liées aux sites de prélèvements** semblent tout de même apparaître dans les deux organes étudiés.

Le site du **Tès** présente notamment des forts niveaux transcriptomiques dans la glande digestive pour les gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant et dans la métabolisation des xénobiotiques chez les deux modèles. Ces résultats sont probablement à associer aux niveaux élevés d'expression observés en **début de cinétique** ; ils coïncident par ailleurs avec une forte production de MTs pour les deux modèles et avec un stade de développement très avancé de la gonade pour les diploïdes. Le rôle de la gamétogenèse dans la hausse des niveaux transcriptomiques au Tès ne peut donc pas être exclu (Jouaux et al., 2010; Normand et al., 2008).

Cette station présente également une augmentation des dommages à l'ADN en juin pour les huîtres diploïdes. On peut supposer que le stress qui en est à l'origine provient d'une **interaction entre la demande énergétique liée à la reproduction et les effets d'une contamination chimique** (Jha, 2008). Ce type de réponse a récemment été observée chez la moule zébrée (Michel et al., 2013). Les fortes concentrations en HAPs mesurées dans le microphytobenthos en septembre confirment cette hypothèse et indiquent potentiellement une exposition supérieure des huîtres par la voie trophique durant la période estivale. Ce type de contamination toujours en interaction avec la forte demande énergétique liée à la reproduction, peut-être à l'origine des expressions géniques relatives mesurées au Tès.

Les résultats obtenus à Ile aux oiseaux présentent des similarités avec ceux du Tès, indiquant un fonctionnement proche des deux stations en lien avec leur proximité géographique. L'évolution des expressions géniques relatives se caractérise par de fortes valeurs en juin pour la plupart des gènes étudiés dans les deux organes. Cela peut encore être mis en lien avec la gamétogenèse comme le confirment les dommages importants à l'ADN mesurés en juin chez les diploïdes, en association avec une contamination supérieure des organismes par les contaminants.

Une observation intéressante peut cependant être faite au niveau de cette station, en lien avec une corrélation significative (Test de Pearson ; $p < 0,05$) entre les **concentrations en HAPs dans l'eau** et l'expression des gènes ***gpx*, *gst*, *mxr*, *sod*, *cat* et *cypl1*** dans les branchies des triploïdes. Ce résultat est cohérent avec la forme dissoute des HAPs dans l'eau qui implique préférentiellement une entrée par les branchies où la réponse biologique est observée. Cette corrélation est la différence principale entre les diploïdes et les triploïdes, et peut souligner un investissement énergétique supérieur dans la défense antioxydante chez les triploïdes. La station Ile aux oiseaux est particulièrement réputée pour être le siège d'une activité touristique très importante en été (Le Berre et al., 2010), qui a pu induire une émission supérieure de HAPs et une réponse transcriptomique de la part des triploïdes.

L'expression de ces mêmes gènes est par ailleurs corrélée significativement aux dommages à l'ADN dans les branchies des deux modèles étudiés ; cela peut être associé à la gamétogenèse comme à la réponse aux polluants.

La station Arguin présente en revanche un fonctionnement différent des deux autres. Les niveaux les plus élevés d'expression pour les deux modèles apparaissent plutôt en septembre. Les biomarqueurs utilisés durant cette étude ne permettent pas d'expliquer ces observations. Les dommages à l'ADN ne varient pas au niveau de cette station contrairement à ce qui a été observé au Tès et à l'Île aux oiseaux, ce qui pourrait indiquer un effort de reproduction inférieur. Il n'est pas rare en effet que les stations les plus externes de la lagune présentent un retard dans les processus liés à la reproduction en comparaison aux stations plus internes (eaux plus froides). Nos résultats sont en accord avec ces affirmations : les variations d'IC et les observations macroscopiques à Arguin ne semblent pas indiquer d'évènements de « pontes ». Le suivi de la reproduction de l'huître creuse dans la baie par l'IFREMER a par ailleurs mis en évidence en 2012 un fort retard dans les épisodes de frai (Perrière-Rumèbe, 2012) avec une première émission significative en troisième semaine d'août pour des organismes transplantés au Tès. Ce « retard » exceptionnel associé aux températures plus froides de l'eau pourrait expliquer l'absence de « ponte » à Arguin.

4.4. Conclusion

L'objectif de cette étude complémentaire était d'utiliser des huîtres triploïdes présentant un effort de reproduction inférieur, pour discerner l'effet de la reproduction de celui de la contamination chimique sur les biomarqueurs étudiés. Les résultats obtenus sont peu concluants, puisque la différence entre les diploïdes et les triploïdes au regard de ces biomarqueurs est très faible. Même si les diploïdes sont les seules à présenter des dommages à l'ADN en lien avec la reproduction, il s'avère que l'effort reproductif des triploïdes est loin d'être négligeable comme l'illustrent les pics de MTs en juillet et les développements gonadiques observés.

Face à des contaminations environnementales aussi basses que celles mesurées ici, les conséquences biologiques de la reproduction n'ont donc pas permis de discerner un effet des contaminants seuls. Une différence marquée en termes de contamination des organismes a été mise en évidence comme lors de nos précédentes approches *in-situ* avec des niveaux de bioaccumulations supérieurs à Ile aux oiseaux et Le Tès par rapport à Arguin qui se présente encore comme un site de référence.

Les triploïdes n'ont montré une réponse différentielle qu'au niveau de la station de l'Île aux oiseaux en juillet, au travers d'expressions géniques relatives particulièrement fortes corrélées à une contamination de l'eau en HAPs légèrement supérieure aux autres stations.

De façon générale, les réponses biologiques observées chez les deux modèles répondent donc à une interaction entre contamination chimique (nourriture, eau, sédiment), effets de la gamétogenèse et paramètres environnementaux (température, disponibilité de la ressource nutritive, etc...).

La mise en place d'expériences complémentaires en conditions contrôlées de laboratoire représente donc une alternative intéressante pour identifier chez ces deux types d'huîtres la réponse face aux HAPs dans les conditions du bassin d'Arcachon. Ces approches permettront de s'affranchir du biais lié à la reproduction et d'adopter une approche plus mécanistique en testant l'effet seul des polluants. Cette expérimentation a été menée et a donné lieu à la rédaction d'un article présenté dans la partie « approche expérimentale ».

5. Bilan du suivi *in situ*

Ce suivi a permis d'acquérir de nombreuses informations, et nous a ainsi permis de mieux comprendre le fonctionnement de l'écosystème en mettant en évidence des tendances à la fois saisonnières et géographiques à l'échelle de la lagune. Il est donc possible de répondre en partie aux questions posées.

Quel est l'état de contamination chimique de la lagune ?

Le calcul des concentrations dans l'organisme entier à partir des données de suivi OSQUAR année 2, permettent de comparer notre étude aux résultats du ROCCH (synthèses cartographiques 2003 - 2007). Cette comparaison indique que les niveaux obtenus dans notre étude sont de l'ordre des médianes nationales : autour de 200 $\mu\text{g/g}$, ps pour le cuivre ; autour de 2000 $\mu\text{g/g}$, ps pour le zinc ; autour de 1,5 $\mu\text{g/g}$, ps pour le cadmium.

Concernant les HAPs, la valeur guide AFSSA de 500 ng/g, ps (AFSSA, 2003) n'a jamais été dépassée dans les huîtres à l'échelle de nos travaux, mais les concentrations mesurées s'en rapprochent au niveau des stations les plus orientales (~ 300 ng/g, ps). Les résultats du ROCCH (synthèse cartographique 2003 – 2007) présentent les concentrations de fluoranthène dans des huîtres sauvages, et indiquent une médiane nationale de 27 ng/g, ps. Nos observations montrent que cette médiane est largement dépassée dans des organismes pourtant exposés moins longtemps (1 an) au niveau des sites Ile aux oiseaux, Le Tès et Eyrac (30 – 40 ng/g, ps).

De façon générale, l'état de contamination chimique de la lagune est donc dans la moyenne nationale en ce qui concerne les métaux. Cependant, bien que les seuils sanitaires ne soient pas encore dépassés pour les HAPs, on observe des niveaux préoccupants au niveau des stations les plus internes. Cet état de fait met en évidence les conséquences de l'hydrodynamisme particulier de la lagune, en lien avec sa structure semi-fermée. La gestion des rejets et de la contamination de cet environnement doit donc être adaptée en fonction de ce paramètre.

Quels sont les compartiments et les polluants concernés ?

Nos analyses concernent principalement le compartiment biotique. Les mesures réalisées ont permis de mettre en évidence un certain organotropisme, indiquant des contaminations en métaux dans les branchies (Cu et Zn) mais également dans la glande digestive (Cd en été). Nous avons également pu détecter des HAPs dans les sédiments de façon récurrente, à des niveaux très variables (lien avec la teneur en matière organique). Cette contamination peut potentiellement être liée à la sédimentation de particules déjà contaminées.

Les propriétés chimiques des HAPs et de précédentes études (Crespo, 2009) permettent d'affirmer que les particules et le sédiment sont les compartiments les plus concernés par ces polluants organiques. Enfin, bien que nos travaux n'aient pas porté sur ces composés, de récentes études font également état d'une présence non négligeable de pesticides dans la lagune à des niveaux de traces (Belles, 2012).

Quelles sont leurs origines potentielles ?

Les origines de ces contaminants sont majoritairement liées à l'anthropisation du bassin versant, avec des provenances variées telles que l'urbanisation (HAPs, pesticides et métaux) et l'agriculture (pesticides et métaux). La zone n'est pas fortement industrialisée, mais ce type d'activités peut représenter une source potentielle de contaminants. Le Bassin d'Arcachon enfin se caractérise par une activité touristique intense en été et par une pratique du nautisme en augmentation depuis les années 80. L'utilisation de peintures anti-salissures et de moteurs représentent ainsi une source non négligeable de contaminants tels que les pesticides ou les HAPs.

L'huître creuse est-elle exposée à cette contamination ? Comment y répond-elle ?

Les paramètres étudiés durant ces travaux (bioaccumulation, MT, génétique) permettent d'affirmer que l'huître creuse est en effet exposée à cette contamination au regard des niveaux de polluants mesurés. Les voies d'exposition identifiées sont mixtes et dépendent de la nature du polluant et de ses propriétés physico-chimiques. La Figure 89 illustre cela en indiquant par les cadres rouges le devenir des polluants et leurs conséquences sur la biologie de *C. gigas*.

Après leur émission, les contaminants sont répartis dans les différents compartiments de la lagune (particules, sédiments, eau) et peuvent donc être potentiellement absorbés lors de la filtration (lien avec la nutrition et la respiration de l'huître). La part de composés ayant traversé les barrières biologiques respiratoires (voie dissoute) et/ou digestives (voie trophique) est donc « stockée » dans les cellules (bioaccumulation) où elle peut exercer un effet délétère sur les composantes cellulaires (production d'EROs). La présence du contaminant et/ou ses effets toxiques peut alors induire des réponses biologiques telles que la production de métallothionéines. Cela a été observé lors de notre étude avec la corrélation forte entre ce paramètre et la contamination en métaux et en HAPs supérieure dans la partie orientale de la lagune (réponse adaptative face au stress oxydant).

Bien que les modulations d'expression génique puissent être induites de la même manière, ce paramètre (expressions géniques relatives) n'a pas permis de retrouver le gradient géographique observé avec les MTs. Les variations semblent principalement dirigées par la gamétogenèse (demande énergétique supérieure et stimulation de la phosphorylation oxydative) et les variations abiotiques du milieu à l'échelle annuelle (apport supérieur de contaminant en hiver ?).

Il est de plus important de tenir compte du fait que l'huître creuse est un animal à forte capacité d'adaptation pouvant supporter de grandes variations du milieu naturel. On peut donc supposer que les défenses antioxydantes de base des organismes suffisent à lutter contre les effets de la contamination chimique supérieure observée à l'intérieur de la lagune. Des expérimentations complémentaires demeurent cependant nécessaires pour comprendre les phénomènes observés en été. Cette période critique dans le cycle de vie de l'huître peut en effet être associée à une sensibilité supérieure aux polluants et nos observations ne permettent pas de discriminer les conséquences d'une contamination des effets de la gamétogenèse.

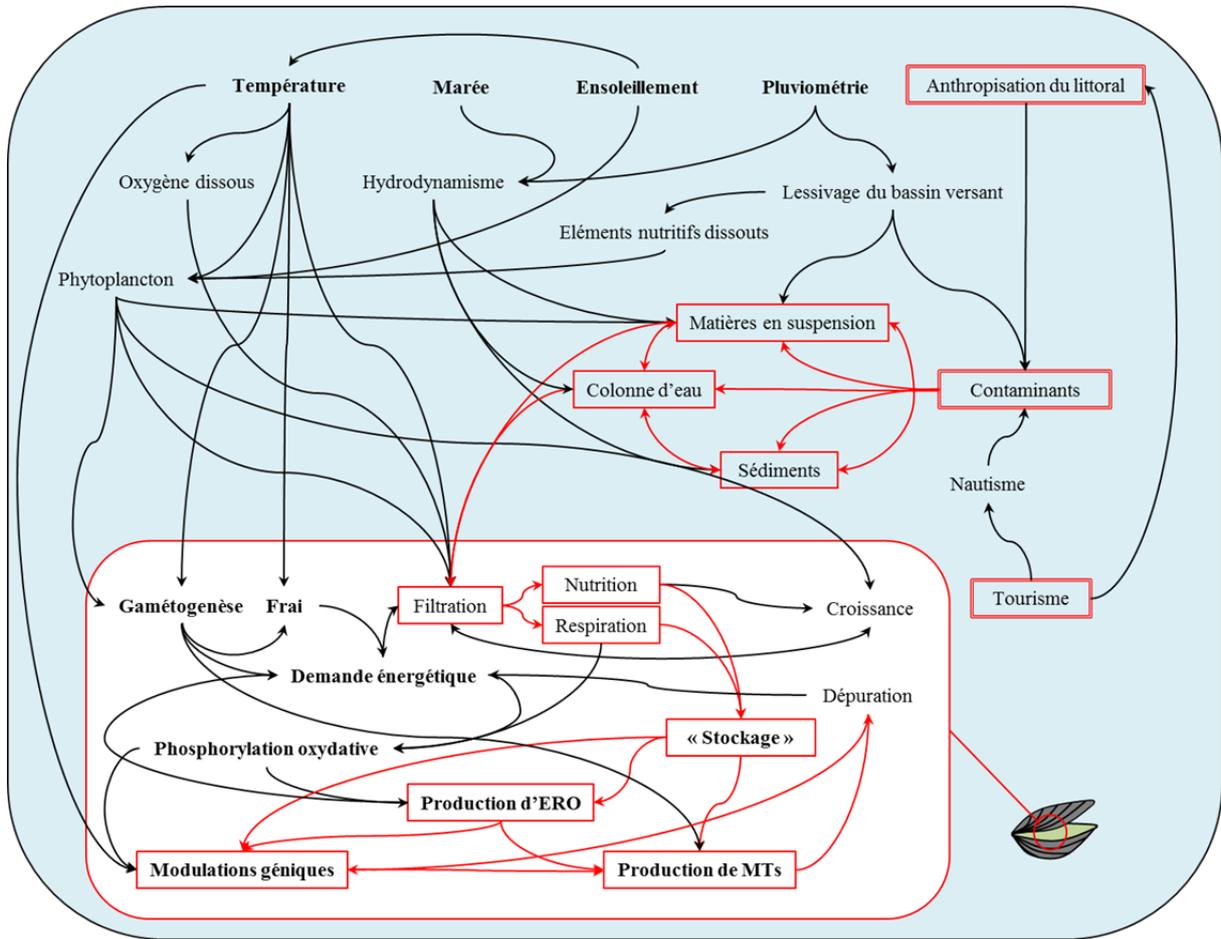


Figure 89 : Schéma récapitulatif des processus impliqués dans la régulation des réponses biologiques de *Crassostrea gigas* face à la contamination chimique de son milieu

Deuxième partie : approche expérimentale

Cette seconde partie concerne les approches complémentaires menées au laboratoire en conditions contrôlées. Il s'agit d'expériences mises en place selon une démarche plus mécanistique visant à répondre à des questions ciblées concernant le comportement et la toxicité de certains contaminants choisis en fonction des études *in situ*.

Ce type d'approche est par essence moins représentative des conditions de vie naturelles des organismes mais consiste en un outil explicatif permettant d'élucider certains mécanismes potentiellement observables sur le terrain.

1.	INTRODUCTION DE L'APPROCHE EXPERIMENTALE	207
2.	EFFETS DES PRODUITS PHYTOSANITAIRES ORGANIQUES ET METALLIQUES SUR L'HUITRE : COCKTAILS ET INTERACTIONS	209
2.1.	<i>Contexte de l'étude</i>	209
2.2.	<i>Principaux résultats et conclusions</i>	210
2.3.	<i>Article: Effects of copper and of a cocktail of organic pesticides on Crassostrea gigas: the specific case of the Arcachon Bay</i>	215
3.	EFFETS BIOLOGIQUES D'UN COCKTAIL DE HAPS ADMINISTRE PAR VOIE TROPHIQUE CHEZ <i>C. GIGAS</i> : ROLE DE LA PLOÏDIE ...	235
3.1.	<i>Contexte de l'étude</i>	235
3.2.	<i>Principaux résultats et conclusions</i>	236
3.3.	<i>Article: Response of the cultivated oyster facing an environmentally relevant PAH contamination; a laboratory approach based on the Arcachon bay case</i>	239
4.	VOIE PREFERENTIELLE DE CONTAMINATION DE <i>CRASSOSTREA GIGAS</i> PAR LE TRIBUTYLETAIN ET EFFETS ASSOCIES	255
4.1.	<i>Introduction</i>	255
4.2.	<i>Matériels et méthodes</i>	255
4.2.1.	Conditions expérimentales et modèle biologique	255
4.2.2.	Stratégie d'échantillonnage et gestion de la contamination	256
4.2.3.	Analyse des métallothionéines.....	257
4.2.4.	Analyses génétiques	257
4.2.5.	Analyses statistiques	258
4.3.	<i>Résultats</i>	258
4.3.1.	Quantification des métallothionéines	258
4.3.2.	Les expressions géniques relatives	259
4.4.	<i>Discussion</i>	260
4.5.	<i>Conclusion</i>	262
5.	CONCLUSION DE L'APPROCHE EXPERIMENTALE	263
5.1.	<i>Bilan des observations réalisées</i>	263
5.2.	<i>Les limites de l'approche expérimentale</i>	264
5.3.	<i>Apports et perspectives de l'approche expérimentale</i>	265

1. Introduction de l'approche expérimentale

Les tests *in-vivo* ont toujours représenté un outil privilégié en écotoxicologie pour l'explication des processus biologiques. Les conditions contrôlées de ce type d'expérimentation permettent en effet de s'affranchir de la variabilité inhérente au milieu naturel et de ne faire varier qu'un paramètre d'intérêt. L'inconvénient de ce type d'approche, bien que fortement explicative, est précisément l'éloignement des conditions de vie naturelles des organismes. Si des résultats expérimentaux sont obtenus sur des organismes dont le conditionnement s'éloigne trop de leur état naturel, toute extrapolation devient hasardeuse. La pertinence de ce type d'étude dépend donc du compromis établi entre « proximité des conditions naturelles » et « contrôle des conditions de vie des organismes ». Les conclusions émises à l'issue de nos travaux sont donc le résultat d'expériences menées pour se rapprocher des conditions de contamination du bassin d'Arcachon, ce qui constitue un point clé de notre étude.

Comme expliqué précédemment, l'approche expérimentale décrite dans la section suivante est un complément de l'approche *in situ*. Cette démarche découle directement des constats réalisés sur le terrain. Des besoins en connaissances plus fondamentales sur les mécanismes de toxicité de certains contaminants nous ont cependant menés à élargir notre champs d'investigation et à adapter nos protocoles expérimentaux. Ces travaux présentent donc un double aspect à la fois fondamental et appliqué. Ils se décomposent en trois parties en fonction des contaminants étudiés :

1) Les produits phytosanitaires

Des travaux menés à l'échelle locale (réseau REPAR ; projets région ASCOBAR et OSQUAR) ont permis de mettre en évidence la présence non négligeable de pesticides organiques dans les eaux de la lagune. Ces composés sont associés aux pratiques agricoles du bassin versant (s-métolachlore et maïsiculture) et à la pratique d'activités nautiques dans le bassin (composés antisalissures). De plus, l'interdiction du TBT dans les peintures antisalissures a causé le retour vers des formulations à base de cuivre ; certains pesticides utilisent également ce métal comme principe actif. Ces constats peuvent expliquer l'augmentation des concentrations en cuivre dans les tissus des huîtres de la lagune. Il a semblé nécessaire d'apporter des éléments de réponse concernant la toxicité de ces composés sur les huîtres. Ils ont donc été étudiés en mélange dans un souci de représentativité, mais également de façon isolée afin de révéler de potentielles interactions entre les contaminants. Un herbicide fortement utilisé à l'échelle globale a également été étudié : le glyphosate et son produit de dégradation, l'acide aminométhyl phosphonique (AMPA).

2) Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les mêmes travaux à l'échelle locale ont permis de mettre en évidence la présence de HAPs dans le bassin d'Arcachon. Ces composés sont principalement présents dans les tissus des huîtres, les sédiments à faible granulométrie et riches en carbone organique, mais aussi dans les particules en suspension dans la colonne d'eau. Bien que cette contamination ne dépasse pas encore les seuils

sanitaires dans les organismes (16 HAPs prioritaires : 500 ng/g, ps), elle demeure supérieure à la médiane nationale au niveau des stations les plus orientales de la lagune (30 – 40 ng/g, ps de Fluoranthène > médiane nationale de 27 ng/g, ps d'après les synthèses cartographiques du ROCCH 2003 – 2007). Il a donc semblé pertinent d'étudier l'effet de ces polluants dans des conditions de contamination similaires à celles du bassin. Des huîtres ont été contaminées par voie trophique (microalgues) grâce à un cocktail de HAPs représentatif de celui retrouvé dans la lagune. Sur un aspect plus fondamental, et en complément des études réalisées sur le terrain, la réponse d'huîtres triploïdes a également été suivie durant cette expérimentation.

3) Tributylétain

Ce composé est connu depuis longtemps dans le bassin d'Arcachon puisqu'il a été la cause d'une véritable crise du secteur ostréicole dans les années 70. Bien qu'interdit d'utilisation, la surveillance de ses effets délétères (imposex) sur les côtes est exigée par la convention OSPAR⁴. Les résultats de cette surveillance indiquent la présence du composé dans des concentrations de type trace (ng/L). L'aspect appliqué de cette expérimentation est donc associé à l'étude des effets toxiques du TBT sur l'huître à des concentrations de l'ordre du ng/L. L'aspect plus fondamental de cette étude porte sur les voies préférentielles d'entrée du contaminant.

⁴ La convention Oslo-Paris du 22 septembre 1992, entrée en vigueur le 25 mars 1998, coordonne les actions de 15 pays européens pour la préservation des écosystèmes de l'Atlantique du Nord-Est.

2. Effets des produits phytosanitaires organiques et métalliques sur l'huître : cocktails et interactions

2.1. Contexte de l'étude

Dans le cadre de notre approche multirésidus, les composés organiques représentent une vaste famille de contaminants potentiels dont les effets sur les milieux aquatiques sont encore trop mal connus. Des travaux récents témoignent cependant de l'intérêt croissant porté à cette classe de polluants (Akcha et al., 2012; Barranger et al., 2014). L'écotoxicologie étant par essence une discipline appliquée en lien avec des problématiques sociétales (Beketov and Liess, 2012), il est nécessaire et logique de baser nos travaux sur les groupes de composés présentant la plus grande pertinence « environnementale ».

Il a donc semblé naturel de s'intéresser aux pesticides dans le contexte du bassin d'Arcachon. Cet hydrosystème constitue le réceptacle final des eaux issues d'un vaste bassin versant (plus de 4000 km² - (Bouchet et al., 1997b)). Les territoires associés se caractérisent par une urbanisation croissante et par des pratiques agricoles liées principalement à la maïsiculture dont les traceurs chimiques (pesticides) ont déjà été identifiés dans les eaux de la lagune (Belles, 2012; Fauvelle, 2012). Bien que l'urbanisation ne soit pas le premier émetteur de composés de ce type, leur utilisation pour l'entretien des voiries, le désherbage et les pratiques domestiques ne peut être négligé par ailleurs.

Les concentrations mesurées sont relativement faibles (majoritairement inférieures aux PNEC), cependant la fragilité de cet écosystème incite à la plus grande vigilance. Le contexte écologique actuel dénote en effet d'une dégradation de la qualité du milieu comme en témoignent la régression des herbiers à zostère (Plus et al., 2010) et les mortalités estivales des naissains d'huîtres. Le bassin d'Arcachon est par ailleurs un haut lieu du tourisme en été (Le Berre et al., 2010), ce qui représente un facteur aggravant concernant la contamination chimique des eaux. Des composés antisalissures présents dans les peintures des coques des bateaux sont ainsi retrouvés de manière significative dans les eaux du bassin d'Arcachon (Belles, 2012) et présentent un risque potentiel pour l'équilibre de l'écosystème.

Dans ce contexte, la présence de cuivre dans les huîtres a également été mise en évidence par des programmes de recherche locaux. Cette observation semble donc indiquer une augmentation de ses apports dans la lagune, potentiellement en lien avec l'interdiction du TBT (Claisse et Alzieu, 1993).

On comprend donc que la qualité chimique des eaux du bassin d'Arcachon revêt un aspect majeur dans la compréhension des facteurs associés à la dégradation écologique du milieu. L'huître étant une espèce emblématique de grande importance économique pour la région et une espèce sentinelle reconnue, il paraît pertinent tant sur le plan scientifique que sur celui de la gestion de la ressource d'étudier l'effet des produits phytosanitaires sur sa physiologie. Les questions posées sont donc les suivantes :

L'huître creuse adulte est-elle sensible aux pesticides organiques employés dans le bassin d'Arcachon ? Le cuivre présente-t-il une toxicité pour cet organisme dans les conditions actuelles de contamination du bassin ?

Peut-on identifier une interaction entre ces deux types de polluants lorsque l'huître est exposée à un mélange représentatif de la pollution de la lagune ?

2.2. Principaux résultats et conclusions

L'étude réalisée ici présente un intérêt dans la compréhension des processus de toxicité susceptibles d'intervenir sur le terrain. Un effort particulier a été fourni pour adapter les concentrations de contaminants aux valeurs environnementales, ce qui souligne la représentativité de cette approche.

Il est par ailleurs important de noter, qu'en dépit des efforts réalisés pour mettre en place ces travaux en début d'année (mars 2012), les dissections des organismes ont révélé un état d'avancement de la gamétogenèse non négligeable. Comme cela a été souligné lors de l'interprétation des travaux *in situ* cet état physiologique implique des niveaux métaboliques élevés chez les huîtres, et peut potentiellement mener à une sous-évaluation de la « toxicité brute » des contaminants étudiés (effets potentiellement masqués par les conséquences biologiques de la gamétogenèse). Nous pouvons cependant considérer que cette observation rapproche notre étude de conditions naturelles selon lesquelles les huîtres peuvent entrer en contact avec les contaminants durant la gamétogenèse.

Il convient donc de souligner que les conclusions issues de ces travaux présentent un intérêt mais que toute extrapolation doit être réalisée avec précautions au regard des niveaux de contamination choisis et des conditions expérimentales qui peuvent varier grandement d'un laboratoire à l'autre.

Au regard des éléments obtenus et des considérations précédentes, nous pouvons donc apporter des éléments de réponse aux questions posées en introduction.

L'huître creuse adulte est-elle sensible aux pesticides organiques employés dans le bassin d'Arcachon ?

Les 8 pesticides employés en cocktail ont clairement induit des inductions géniques cohérentes avec les données de la littérature et l'apparition d'un stress oxydant (Figure 90). Ce constat est souligné par les données de protéomique qui indiquent un effet délétère vis-à-vis des protéines de réponse au stress elles-mêmes. Les fonctions métaboliques associés au traitement des EROs ont été activées (*sod* et *cat*) de manière particulièrement intense, ce qui dénote d'une acclimatation des huîtres face à la contamination. La surexpression du gène *gst* associé aux mécanismes de métabolisation de phase II souligne également la capacité de l'huître à dégrader les xénobiotiques. L'occurrence tardive de ces réponses indique un délai avant l'apparition des premiers effets toxiques. De telles considérations ne peuvent cependant pas être appliquées au milieu naturel dans lequel les huîtres sont exposées durant de longues périodes aux contaminants. On peut donc s'interroger sur les résultats à plus long terme d'une contamination de ce type, ce qui invite à de nouvelles expérimentations plus représentatives en termes de cinétique. On peut donc affirmer que l'huître adulte est sensible aux pesticides retrouvés dans la lagune dans les mêmes gammes de concentrations. Cet organisme connu pour sa grande plasticité phénotypique semble en revanche répondre « positivement » à ce type de contamination et s'y adapter.

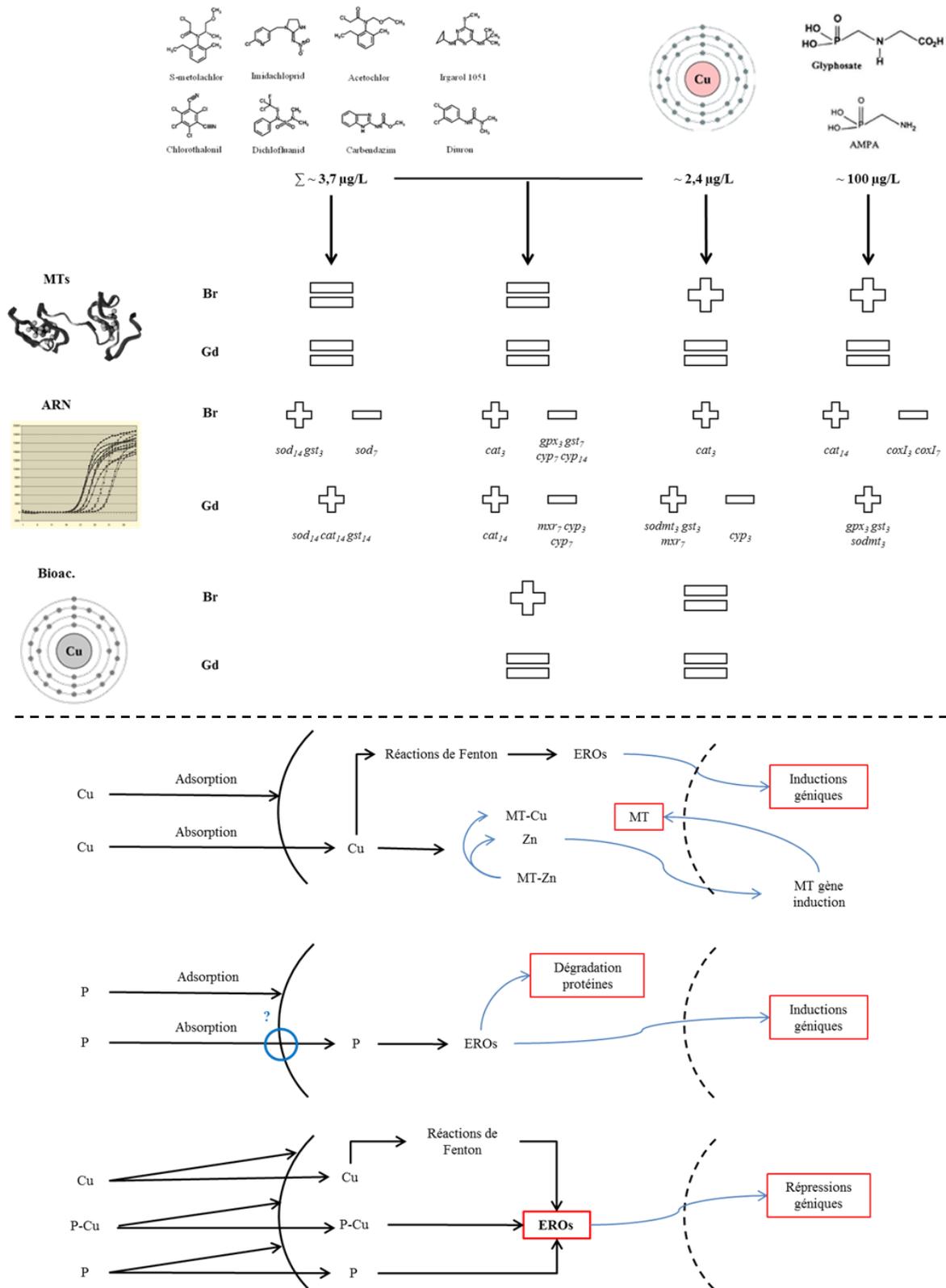


Figure 90 : Principaux résultats et mécanismes de toxicité supposés mis en évidence durant l'exposition des huîtres à un cocktail de pesticides

Les symboles « - ; + ; = » indiquent les diminutions, absences d'effets, et augmentations pour les différents paramètres contrôlés. Les gènes modulés par l'exposition aux contaminants sont indiqués ; le point de prélèvement concerné par la variation apparaît en indice. Les schémas présentent les voies d'entrée des contaminants dans la cellule (ligne noire continue) et leurs effets potentiels. Le noyau est matérialisé par un trait pointillé. Les abréviations sont les mêmes que celles de l'article.

De plus amples informations sont cependant nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués (Figure 90). La toxicité des composés est en effet directement tributaire de leur faculté à traverser les membranes biologiques. Cet aspect varie d'un composé à l'autre et est avant tout dirigé par la spéciation du contaminant et donc les conditions physico-chimiques du milieu. Notre expérience ayant été réalisée dans de l'eau de mer artificielle en absence de particules, nous pouvons raisonnablement supposer que les processus d'internalisation dans le milieu naturel diffèrent sensiblement de ceux impliqués dans nos travaux. L'interaction avec la matière organique dissoute abondante dans la nature représente également un facteur d'intérêt pouvant moduler la toxicité de ces composés.

Le cuivre présente-t-il une toxicité pour cet organisme dans les conditions actuelles de contamination du bassin ?

Les concentrations appliquées dans notre étude sont de l'ordre de 2,4 µg/L ce qui se rapproche grandement des conditions de vie des huîtres dans le bassin d'Arcachon. En dépit de niveaux très faibles, ce métal pourtant essentiel a induit une réponse adaptative chez les organismes exposés. La production de métallothionéines est cohérente avec la contamination par un métal (Figure 90). Il est probable que cette production ait été soutenue par l'apparition d'un stress oxydant et par la production d'EROs comme les inductions géniques le laissent supposer (Figure 90 : induction de *cat* après 3 jours). Cette toxicité semble s'exercer par ailleurs au niveau de la mitochondrie comme en témoigne l'induction de *sodmt*. Elle est précoce avec des résultats significatifs dès 3 jours, et transitoire puisque ces modulations disparaissent par la suite (aucune modulation génique après 14 jours).

Il semblerait donc que ce métal essentiel réponde à une régulation importante et qu'un excès, même faible comme c'est le cas ici, induise une réponse adaptative. Cette homéostasie peut se traduire par l'accumulation non significative du métal seul, qui est probablement sujet à une excrétion active hors de la cellule comme en atteste l'induction de *mrx* après 7 jours.

On peut donc affirmer que dans nos conditions expérimentales, la contamination par le cuivre est parfaitement gérée physiologiquement par les organismes. Les effets observés peuvent potentiellement être associés à une production d'EROs issues des réactions de Fenton (Figure 90). Il est important de considérer également la biodisponibilité du métal qui est directement conditionnée par la physico-chimie du milieu, la présence de particules et de matière organique. L'extrapolation au milieu naturel est donc limitée au regard des conditions expérimentales mises en place ici (eau de mer artificielle).

Les concentrations de ce métal sont néanmoins en augmentation dans les huîtres prélevées sur le terrain, ce qui engage à la prudence. De nouvelles expériences devraient être menées dans un souci de représentativité, pour se rapprocher des conditions de vie du bassin d'Arcachon.

Peut-on identifier une interaction entre ces deux types de polluants lorsque l'huître est exposée à un mélange représentatif de la pollution de la lagune ?

Nos résultats indiquent clairement une interaction entre ces deux types de contaminants. Il est possible que les observations faites ici correspondent à une réponse face à une toxicité multiple : effet du cuivre seul ; effet des pesticides ; effets de complexes cuivre-pesticides (Figure 90).

Les voies métaboliques impliquées dans ces réponses peuvent également interagir et interférer entre-elles, ce qui souligne la complexité de la réponse biologique face à des mélanges de contaminants. Il s'agit pourtant de la condition expérimentale se rapprochant le plus du milieu naturel, ce qui engage à de plus amples recherches concernant les mécanismes de toxicité impliqués.

Les biomarqueurs utilisés ici semblent mettre en évidence une toxicité du mélange liée à une production d'EROs. Les répressions géniques observées (*gpx*, *gst*, *cyp*, *mxr*) peuvent en effet résulter d'une dégradation des ARNs par les espèces réactives de l'oxygène.

On serait donc en présence d'une dégradation du transcriptome en lien avec un stress oxydant probablement plus intense que ceux précédemment mentionnés dans le cas des contaminations isolées. Les surexpressions des catalases pourraient être interprétées comme une réponse biologique ayant pour but d'endiguer la toxicité du mélange visible au niveau des répressions des autres gènes.

Bien que très différentes des effets des contaminations isolées, les conséquences d'une exposition au mélange semblent plus importantes. Les réponses géniques sont transitoires et modérées, indiquant une toxicité de faible envergure.

Il est cependant important de considérer la potentielle sous-évaluation de la toxicité en lien avec les conditions expérimentales. On peut donc raisonnablement considérer qu'une interaction entre ces deux catégories de contaminants existe, et qu'elle tend à induire des effets plus délétères qu'une contamination simple. Une exposition dans le milieu prolongée à ce type de toxicité, associée aux effets d'autres polluants est donc susceptible de provoquer chez l'huître des effets potentiellement plus graves.

Ces travaux donnent donc des pistes de travail pour l'avenir, aussi bien au niveau des biomarqueurs pertinents à employer qu'au niveau des considérations techniques à prendre en compte pour travailler à des niveaux environnementaux de contamination. Il semblerait par exemple pertinent d'étudier la complexation du cuivre avec les polluants organiques et de s'interroger sur les voies d'entrée de ce type de complexe. La métabolomique pourrait également donner des indications sur les produits de dégradation des pesticides et sur les dégâts causés sur les biomolécules. L'apparition du stress oxydant largement mentionné dans ces travaux devrait également être étudié par la quantification des EROs ou de leurs effets (ex. peroxydation lipidique). Notons enfin que l'outil transcriptomique est d'autant plus pertinent à l'heure actuelle que le génome de l'huître a été séquencé, ce qui permettrait l'utilisation de gènes pertinents vis-à-vis des effets des pesticides.

2.3. Article: Effects of copper and of a cocktail of organic pesticides on *Crassostrea gigas*: the specific case of the Arcachon Bay

Status: to submit

Hugues BIJOUX¹, Patrice GONZALEZ¹; Nicolas ABAR¹, Xu MING², Sandra MOUNICOU², Magalie BAUDRIMONT¹ and Hélène BUDZINSKI^{1*}

1. Université de Bordeaux, UMR EPOC 5805, teams LPTC (Talence) and EA (Arcachon)

2. LCABIE UMR 5254, 2 avenue du Président Angot, 64053 Pau

* Corresponding author. Tel.: +33 5 56 22 39 21; +33 5 56 54 93 83.

E-mail address: h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr (H.Budzinski).

Keywords: Crassostrea gigas, Arcachon bay, Copper, Pesticides, Glyphosate, Oxidative stress

Abstract

The economic sector of oyster farming in the Arcachon bay goes through an important crisis characterized by massive summer mortalities of juveniles, and more recently, of adults. In this context, the effect on oyster physiology of an organic pesticides cocktail made of the 8 most abundant molecules found in the bay was studied using environmental level of contamination. The potential interaction between these compounds and copper was assessed during 14 days exposures. The toxicity of glyphosate and its degradation product the aminomethylphosphonic acid (AMPA) were also studied separately. The quantification of the metallothioneins as generic stress indicators and the study of the relative gene expression levels of 10 stress genes by RT-qPCR were performed after 3, 7 and 14 days.

The main results of our experiments evidenced an interaction between copper and the organic compounds promoting the metal accumulation in the gills and the rests of the soft bodies. The biological responses of the mixed treatment were characterized by global gene repressions, highlighting the toxicity of the mixed treatment regarding the antioxidant functions of the oysters.

The isolated contaminations on the contrary showed up-regulated patterns of expressions associated to an adaptive response of the organisms. However, proteomic analyses indicated a deleterious effect of the pesticide cocktail toward proteins' integrity. The glyphosate and the AMPA seemed to induce an adaptive response as well, but at the mitochondrial level.

Globally, the biological responses observed were associated to oxidative stress. This study highlights also the importance of the animals' history, as the adults used here were originated from the bay itself and probably already adapted to this kind of contamination.

1/ Introduction

Coastal ecosystems are vulnerable interface areas known for their high productivity and their economic importance (Costanza et al., 1997). Their attractiveness results in a rapid increase of the anthropic pressure at a local scale. This phenomenon is evidenced by several processes such as demographic expansion in relation with pollutants emissions. The contaminants involved are from various origins (e.g. water sport, domestic wastes, agriculture...) and their toxic potential is likely to modify the ecosystem functioning.

This assumption is in accordance with the degradation of the Arcachon bay ecology recently observed. This semi-enclosed lagoon of south-western France was famous for sheltering the first European sea grass bed of dwarf grass (*Zostera noltei*). However, the surface area of this unique aquatic meadow decreased of 33% during the last twenty years (Plus et al., 2010). The bay is also renowned for being one of the major French oysters farming site, providing 60% to 70% of the French spat according to the shellfish farming regional comity of Arcachon Aquitaine. Nevertheless, summer mortalities events of the juveniles (40% to 100%) seriously questioned this status (Cochennec-Laureau and Baud, 2008) during the last decade. The national project MOREST (MORTaliés ESTivales de l'huître creuse – Ifremer) highlighted amongst other things a potential role of the chemical contamination in the occurrence of these mortality events (Soletchnik et al., 2007). As these problematic were poorly investigated in the past, it is then legitimate to study the deleterious effects on the oysters' physiology of the toxic compounds found in the bay waters.

Local research programs have already performed field monitoring in various compartments (e.g. water, sediment, biota) aiming to identify the most widely distributed pollutants in the bay. Pesticides of diverse origins were identified, proving then to be relevant compounds of interest for our study (Belles, 2012). This choice is also justified by the documented toxicity of these organic pollutants towards oysters (Gagnaire et al., 2007; B. Gagnaire et al., 2006) and their large-scale use in the catchment area of the bay.

The same field studies evidenced a statistical correlation between copper uptake in reared oysters and their metallothioneins content, suggesting an adaptive response of the organisms. This metal is essential to life (Festa and Thiele, 2011) but is also widely used in phytosanitary products (e.g. antifouling paints) especially since tributyltin regulation in the early 80's (Claisse and Alzieu, 1993). This ban induced an increase over the years of the oysters' copper content in the bay, justifying therefore our interest for this contaminant.

Glyphosate, as the most used herbicide in the world (Botta et al., 2009), is subsequently found in natural (Veiga et al., 2001) and urban systems (Glozier et al., 2012) with its main degradation product the aminomethylphosphonic acid (AMPA). The toxicity of these compounds has been documented since the 80' (Carlisle and Trevors, 1988) and deleterious effects on human beings have been already reported (Thongprakaisang et al., 2013; Zouaoui et al., 2013). The potential effects of these

controversial pesticides on aquatic systems are however incompletely understood, and were evaluated in this study.

The aim of this study, in this context of ecological crisis, was then to learn more about the genetic and biochemical responses of *Crassostrea gigas* facing a typical contamination of the Arcachon bay. This approach is a mechanistic laboratory study, and environmentally relevant levels of contamination were adopted in order to fit with the field data. Copper and a representative cocktail of 8 pesticides were used in isolated and mixed treatments so that potential interaction between contaminants could be assessed. The effects of glyphosate and its main degradation product the AMPA were studied as well.

2/ Materials and methods

2.1/ Experimental design and sampling strategy

9 glass experimental units (EU) of 120L filled with artificial sea water (35 psu) were used during the experimentation (Figure 1). A permanent flowing system was set-up using 2 EU as clean water tanks and peristaltic pumps. Uncontaminated water was then delivered to the contaminated tanks: glyphosate + AMPA (G/A), copper (C), pesticides (P), copper + pesticides (C/P); an overflow system maintained a stable volume so that 50% of the total volume was renewed every day. The last EU was used as a wastewater collector and equipped with two pumps filled with activated charcoal in order to scavenge contaminants from our experimentation.

24 months oysters originating from a clean Arcachon bay site (Arguin) were purchased and equitably allocated in the three clean water tanks for a 7 days acclimation. Temperature of the EUs was set-up at 13°C and an alternation of 12h/12h of dark and light was respected. No food was provided in order to prevent contamination from the trophic route. In the same time, contamination was set-up in the other EU in order to reach chemical balance by saturating the potential adsorption sites of the tanks.

At the beginning of the exposure, all the oysters were removed from the two clean water tanks and randomly placed in every contaminated EU (35 per EU). Only half of the oysters were moved from the Ctrl tank to the Ctrl/ACN.

Five individuals were sampled in every EU after 3, 7 and 14 days. Oysters were dissected in order to separate gills and digestive glands from the rests of the soft bodies. Organs were weighted and shells were weighted and measured. Samples of gills and digestive glands were conserved for genetic analyses in microtubes filled with RNA-later at -80°C. The same samples were prepared without RNA-later for metallothionein analyses plus the rests of the soft bodies and stored under nitrogen atmosphere at -80°C. Finally, samples of the three organs were stored at -20°C for copper analyses concerning the Ctrl/ACN, C and C/P treatments. Five additional organisms were sampled before contamination (T_0) and after 14 days of exposure (T_{14}) in order to perform complementary proteins analyses for the P treatment. The gills and the digestive glands were pooled and stored at -80°C in this purpose.

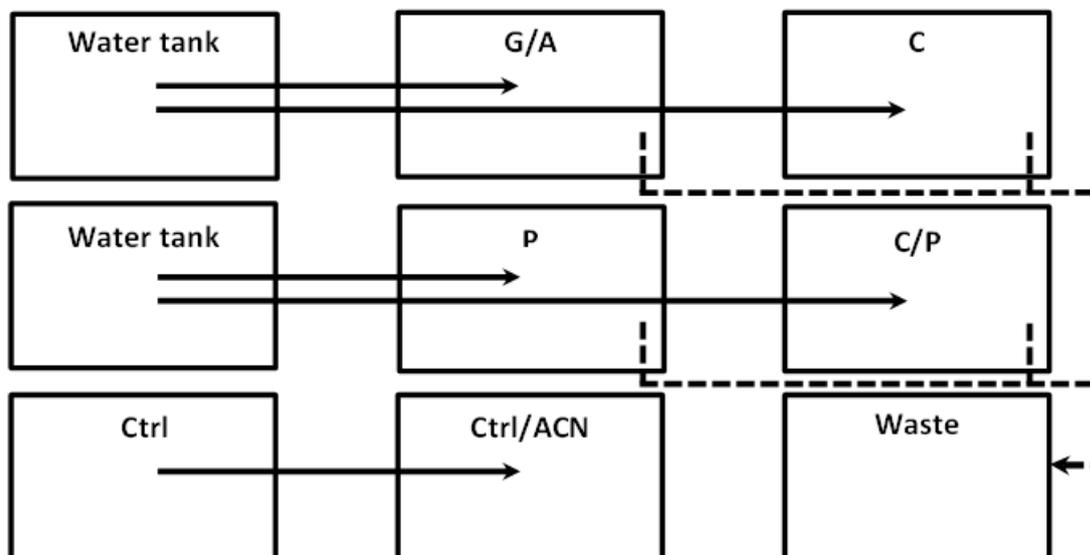


Figure 1: Schematic representation of the experimental setup. Solid lines: water inputs; dotted lines: water outputs
(G/A: Glyphosate/AMPA; C: Copper; C/P: Copper/Pesticides; P: Pesticides; Ctrl: Control; Ctrl/ACN: Control ACN)

2.2/ Contamination management

The P and C/P EUs were contaminated with 8 pesticides (Figure 2) at environmental levels with the same proportions found in the bay (Table 1) with two single syringe pumps (Thermo Fisher Scientific -Waltham - MA - USA). Solutions of contamination were delivered at a rate of 1.6 mL/h to maintain stable concentrations in the tanks. These cocktails were prepared from a single pesticides mix of imidachloprid (570 ng/g), S-metolachlor (2400 ng/g), irgarol (45 ng/g), carbendazim (32 ng/g), chlorothalonil (15 ng/g), dichlofluanid (15 ng/g), acetochlor (46 ng/g) and diuron (72 ng/g); compounds were individually purchased from Cluzeau Info Labo (C.I.L. – Sainte Foy la Grande – France) and dissolved in acetonitrile (ACN). The C and C/P EUs were contaminated with copper at a level of $2.6 \pm 0.7 \mu\text{g Cu/L}$ and $2.2 \pm 0.3 \mu\text{g Cu/L}$ (mean day 1-14 \pm SD), using a peristaltic pump. A single solution of CuCl_2 was delivered into the tanks at a rate of 20 mL/h. This solution was daily prepared by diluting 1250 μL of a stock solution at 1g CuCl_2/L in 1L of ultra-pure water. The stock solution of copper was prepared prior to the exposure by diluting a standard vial of CuCl_2 (1000 mg CuCl_2 Titrisol – Merck Millipore – Darmstadt – Germany) into 1L of ultra-pure water in a Teflon bottle before storage at 4°C. The same protocol was used to deliver a solution of glyphosate and AMPA into the G/A EU. Targeted concentrations in the EU were 100 $\mu\text{g/L}$ for each compound. Solutions of contamination were prepared every three days by diluting 4.17 g of a stock solution in 500 mL of ultra-pure water. The stock solution was prepared before the experimentation by dissolving 150 mg of glyphosate and 150 mg of AMPA (C.I.L. – Sainte Foy la Grande – France) into 125 mL of ultra-pure water before storage at -20°C. A peristaltic pump was used to deliver ACN to the Ctrl/ACN EU in order to maintain the same solvent concentration as in the P and C/P EUs (0.6 mL ACN/L – 0.07% of the total volume).

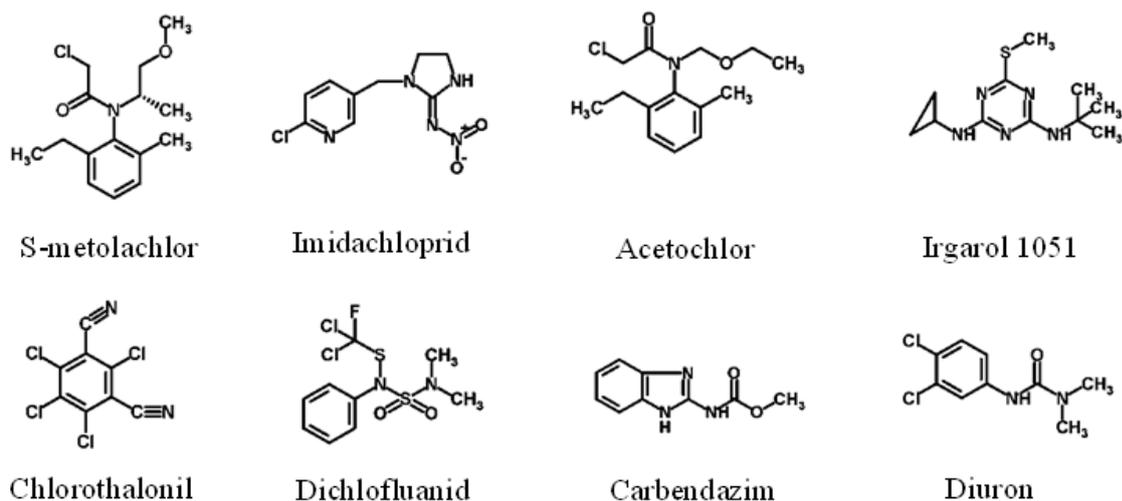


Figure 2 : Composition of the pesticide cocktail. (molecules adapted from Chemspider website: <http://www.chemspider.com/>)

Table 1: Experimental concentrations and main chemical characteristics of the 8 compounds used in the cocktail

Compound	CAS	Use	Formula	Mass (g/mol)	log K_{ow}	Concentration ($\mu\text{g/L}$)
Imidacloprid	138261-41-3	Insecticide	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClN}_5\text{O}_2$	255.7	0.6	0.600
S-metolachlor	87392-12-9	Herbicide	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{ClNO}_2$	283.8	2.0	3.000
Acetochlor	34256-82-1	Herbicide	$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{ClNO}_2$	269.8	4.1	0.040
Diuron	330-54-1	Herbicide	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$	233.1	2.9	0.050
Irgarol 1051	28159-98-0	Algicide	$\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{S}$	210.9	4.0	0.025
Carbendazim	10605-21-7	Fungicide	$\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	191.2	1.5	0.030
Dichlofluaniid	1085-98-9	Fungicide	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{FN}_2\text{O}_2\text{S}_2$	333.2	3.5	0.010
Chlorothalonil	1897-45-6	Fungicide	$\text{C}_8\text{Cl}_4\text{N}_2$	265.9	2.9	0.010

Source: National Institute of Industrial Environment and Risks (<http://www.ineris.fr/substances/fr/>)

2.3/ Copper bioaccumulation

After dissection, gills, digestive glands and homogenized rests of the soft bodies were stored at -20°C . The organs were dried at 48°C during 48h prior to the analyses, weighted and digested in 3 mL of nitric acid (HNO_3 – Merck, Darmstadt, Germany) at 100°C during 3h. Acid blanks without matrix and reference samples (certified materials Tort-2 and Dolt-4 – National Research Council Canada – 50 to 100 mg) were digested additionally in order to check for potential contamination of the mineralization step and evaluate the quantification accuracy of the analytical device.

Samples were then diluted with 15 mL of ultra-pure water and stored at 4°C until the analyses were performed. Flame Atomic Absorption Spectrometry (Air/Acetylene - FAAS – Varian AA20 - Australia) was used to measure the copper concentrations of the samples ($\lambda=324.8$ nm; LD = 20 μg Cu/L).

2.4/ Metallothioneins determination

The extraction was performed with 50 to 150 mg of gills, digestive gland or rest according to the method described by Baudrimont and coworkers (Baudrimont et al., 1997). Tissues were grinded in 1 mL of 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2 at 20°C) on ice and under nitrogen atmosphere using a tissue homogenizer (T10 - IKA Ultra-Turrax). Centrifugation (1h; 20000 g) was performed at 4°C and samples were duplicated by sampling 2 x 200 µL of supernatant into 1.5 mL polypropylene microtubes; 3 blanks and 3 reference samples were prepared additionally (3 X 200 µL of 25 mM Tris-HCl buffer and 3 X 200 µL of diluted rabbit liver metallothionein solution at 10 µg MT/mL purchased from Sigma Aldrich).

200 µL of an acid inorganic mercury solution were added (HgCl₂ at 10 mg/L and 10% of trichloroacetic acid) in order to precipitate high molecular weight proteins and to saturate metallothioneins. After homogenization and 10 min of incubation, 400 µL of a porcine hemoglobin solution (1g of porcine lyophilized hemoglobin purchased from Sigma-Aldrich + 40 mL of 30 mM Tris-HCl buffer) were added to every sample aiming to scavenge the excessive Hg(II). Centrifugation was then quickly performed during 20 min at 20000 g and supernatants were recovered.

Finally mercury burdens were quantified in 100 µL of every sample using atomic absorption spectrometry (LECO AMA 254, ALTEC, Prague, Czech Republic) so that MTs concentration of the whole organ could be indirectly deduced and expressed in nmol Hg binding sites/g, fw.

2.5/ Genetic analysis

Total RNAs were extracted from 30 - 50 mg of gills and digestive glands (n = 5 per condition and sampling time) using the Absolutely RNA Miniprep Kit (Agilent technologies) according to manufacturer's instructions. RNAs were stored at -80°C until retro-transcription into single stranded cDNA was performed. 14 µL (3 to 5 µg) of total RNAs were used to perform the reaction with the AffinityScript cDNA Synthesis Kit (Agilent technologies) according to manufacturer's instructions. The resulting cDNA were stored at -20°C until the RT-qPCR was performed. This step was realized using Brilliant III Ultrafast SYBR QPCR kits (Agilent technologies) according to manufacturer's instruction in a Stratagene Mx3000P thermocycler (Agilent technologies). The thermal profile was composed of 1 cycle of 10 min at 95°C and 40 amplification cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 55°C and 30 s at 72°C. Cycle thresholds (C_t) were obtained with MxPro – Mx3000P software (Stratagene 2007).and the relative gene expressions of 10 genes (Table 2) involved in stress responses were assessed by the 2^{-ΔCt} method of Livak and Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001) after normalization according to β-actin expression. Mean fold inductions (MFI) were calculated between each treatment and its respective control when significant differences of expressions were obtained following this equation:

$$MFI=2^{(-\Delta C_t \text{ treatment})} / 2^{(-\Delta C_t \text{ control})}$$

Table 2: Accession numbers and specific primer pairs for the 10 genes from *C.Gigas* used in qPCR.

Gene name and function	Accession number	Forward primer	Reverse primer
Mitochondrial metabolism			
<i>coxI</i>	AB033687	GTGCCAACTGGTATTAAGGTGT	ACACCGCACCCATTGAT
Oxidative stress response			
<i>sod</i>	AJ496219	CCAGAGGATCACGAGAGGC	GCGTTTCCGGTCGTCTT
<i>cat</i>	EF687775.1	GTCGTGCCCTTTACAACC	CGCCCGTCCGAAGTTT
<i>sodmt</i>	EU420128	ACAAAGTCAATCAGTGCCCT	CCATTGCCTCTGCCAGT
<i>gpx</i>	EF692639	ATCGAACGCTGCACCA	AGCTCCGTCGCATTGT
Detoxification			
<i>mt1</i>	AJ242657	TGTCTGCTCTGATTCTGTGCC	GGTCCTTTGTTACACGCACTCATT
<i>mt2</i>	AJ297818	TCCGGATGTGGCTGCAAAGTCAAG	GGTCCTTTGTTACACGCACTCATT
<i>mxr</i>	AJ422120	AGGAAGGGCAGTTGAGTG	CGTTGGCCTCCTTAGCG
Metabolization			
<i>cyp1A1</i>	EF645271	AGGCATAGGGCTCCAC	CTGGTTTCGCGGGTTTCAT
<i>gst</i>	AJ557140	AGGCTACCGAAATGGCTG	CTCTGACTTGAATAGGCCCG
Reference			
<i>β-act</i>	AB071191	AGTACCCCATGAACACGG	TGGCGGGAGCGTTGAA

Abbreviations: *mt*: metallothionein; *coxI*: cytochrome C oxidase subunit I; *gpx*: glutathione peroxidase; *sod*: superoxide dismutase; *cat*: catalase; *sodmt*: mitochondrial superoxide dismutase; *mxr*: multixenobiotic resistance, *gst*: glutathione S transferase, *cyp*: cytochrome P450, *act*: actin.

2.6/ Proteomic analysis

Reagents: All the gel electrophoresis reagents including 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Tris, > 99%), 30% acrylamide/bis-acrylamide solution, sodium dodecyl sulfate (SDS, > 98%), ammonium persulfate (APS, > 98%), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED, > 99%), urea (99.0~100.5%), dithiothreitol (DTT, > 99%), 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS, > 98%), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF, > 99%), iodacetamide, agarose and glycine (> 99%) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). The immobilized pH gradient (IPG) strips (18 cm, pH 3-10) and IPG buffer (pH 3-10 NL) were from GE Healthcare (Orsay, France). Water (18 MΩ cm) was obtained from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA). Unless stated otherwise, all others analytical reagent grade chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Proteins extraction: Gills and digestive glands were homogenized with an ice-cold extraction buffer solution (50 mM Tris, 250 mM Sucrose, 1 mM PMSF, pH 7.4) with liquid nitrogen grinding. Each aliquot of tissue sample (1 g) was homogenized with 1.9 mL of buffer and the homogenate was left to stand for 1 h at 4 °C for protein dissolution. Then the homogenate was centrifuged at 12,000 rpm for 30 min at 4 °C. The supernatant was centrifuged another 30 min at this speed and then filtered with 0.2 μm membrane centrifugal filters. An aliquot (50 μL) of the supernatant was put aside for protein quantification by external standard calibration using a BCA Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich). The absorbance was monitored with a STAT FAX 303 Plus Microstrip Reader (Block Scientific Inc., Bohemia, USA) at 545 nm.

2-DE gel electrophoresis: Proteins in cytosolic samples were precipitated with ice-cold 10% trichloroacetic acid in acetone and wash with 100% ice-cold acetone. The protein pellet was air dried

and stored at -20 °C. For 2-DE experiment (n=3), 5 mg of each protein pellet were dissolved in 1 mL re-hydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 65 mM DTT, 0.2% IPG buffer, 0.01% bromophenol blue). Then 300 µL of protein solutions were loaded onto 18 cm, pH 3-10 IPG strips and left for re-hydration overnight. Isoelectric focusing (IEF) was performed at 250 V for 0.5 h, 1000 V for 0.5 h, a gradient up to 6000 V for 4h, and finally 6000 V until 40 kVh on an IEF-SYS system (biostep GmbH, Meinersdorfer, Germany). After IEF, strips were equilibrated in 2% DTT (15 min) and 2.5% iodoacetamide (15 min) consecutively. The equilibrated strips were transferred to the top of 12% polyacrylamide gels (375 mM Tris (pH 8.8), 0.01% SDS, 0.01% APS and 0.001% TEMED) for the second dimension. The second dimension gel electrophoresis was carried out at 100 V for 0.5 h and 180 V for 4 h on a Maxi protein unit TV400 system (biostep GmbH, Meinersdorfer, Germany). The gels were stained with 0.1% Coomassie brilliant blue R250 solution. ColorBurst Electrophoresis Marker (220 ~ 8 kDa, Sigma-Aldrich) was used in 2-DE experiments.

Protein spot analysis: The gels were imaged with an AGFA ARCUS II Scanner and the results were analyzed using 2D Platinum Software Version 5.0 (GE Healthcare, Orsay, France). Image analysis including spot detection, spot quantification, background subtraction, and spot matching was processed. Protein spots which have significant difference ($p < 0.05$, $n = 3$, Student's t-test) between control and P-exposed groups were chosen for further identification by MS/MS, and their fold changes ($\%V_{\text{contaminated}} / \%V_{\text{control}} > 1.5$) were calculated based on their relative spot volumes ($\%V$).

Protein identification by µRPC-ESI-MS/MS: For identification, differentially expressed protein spots were excised from the gels and in-gel digested according to the following protocol. The excised pieces of gel were washed with 500 µL H₂O for 10 min and then three times with 50 mM NH₄HCO₃, 50% acetonitrile (ACN) until the blue color disappeared. After washing with 100% ACN and air drying, 1 µL trypsin solution (50 ng µL⁻¹, proteomics grade) was added for overnight digestion at 37 °C. The mixture of peptides was analyzed by µRPC-ESI-MS/MS. µRPC-ESI-MS/MS analysis was performed with an Agilent 1100 capillary HPLC system (Agilent, Tokyo, Japan) and an electrospray LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). 8 µL of peptide mixtures were injected and separated into a Vydac C18 column (150 mm X 1 mm ID, 5 µm, Alltech/Grace, Templemars, France). The flow rate was 50 µL min⁻¹ of 0.05% formic acid in H₂O (solvent A) and ACN (solvent B). The gradient program lasted for 3 min at 2% B and then increased to 50% linearly in 35 min. Between each run, the column was equilibrated at least 10 min at 2% B. The MS was operated in the positive ion mode and the m/z 350 to 2000 range was scanned with a resolution set at 100,000 (m/m, fwhm (full width at half maximum) at m/z 400). The spray voltage and capillary temperature were respectively set at 3.3 kV and 300 °C. The three most intense ions of each full scan were selected to be fragmented using collision induced dissociation (CID) at normalized collision energy of 35%. The raw data were analyzed using Xcalibur 2.1 software (Thermo Fisher Scientific). For database search, raw data files were converted to Mascot generic format (Mgf) files and searched in the National Center for Biotechnology Information (NCBIInr) database via Mascot Search (version 2.4, Matrix Science) with Other Metazoa as taxonomy. Mascot search parameters

included trypsin as the proteolytic enzyme with 1 missed cleavage. Peptide and MS/MS tolerances were set at 50 ppm and 0.1 Da, respectively. The modifications of carbamidomethyl and methionine oxidation were selected. Peptide charge was set to +1, +2 and +3. A minimal Mascot score of 25 and two different peptides were set for protein identity validation.

2.7/ Statistical analysis

XLSTAT software (Addinsoft 2013) was used to perform all the statistical analyses. Parametric methods were used to analyse the metallothioneins data and copper concentrations. Levene and Shapiro-Wilk tests were used to assess homoscedasticity and normality of data. Therefore, two ways analyses of variance (ANOVA) were performed to assess treatment and/or time effects upon the studied variables. The post-hoc Highest Significant Difference test of Tuckey (Tuckey-HSD) was employed in case of significant result ($p < 0.05$). As normality could not be obtained for genetic data, non-parametric methods were employed. The Kruskal-Wallis one way analyses of variance was performed for each sampling time to identify potential treatment effect. In case of significance, the post-hoc pairwise multiple comparison of Conover-Iman was used.

Statistical tests concerning the solvent enriched treatments (Ctrl/ACN; P; C/P) were realized separately from the solvent free treatments (Ctrl; C; G/A) for the MTs and genetic data.

3/ Results

3.1/ Copper accumulation

The treatment effect detected by the ANOVA is represented in the Figure 3 by averaging copper concentrations obtained during the whole exposure for every experimental condition.

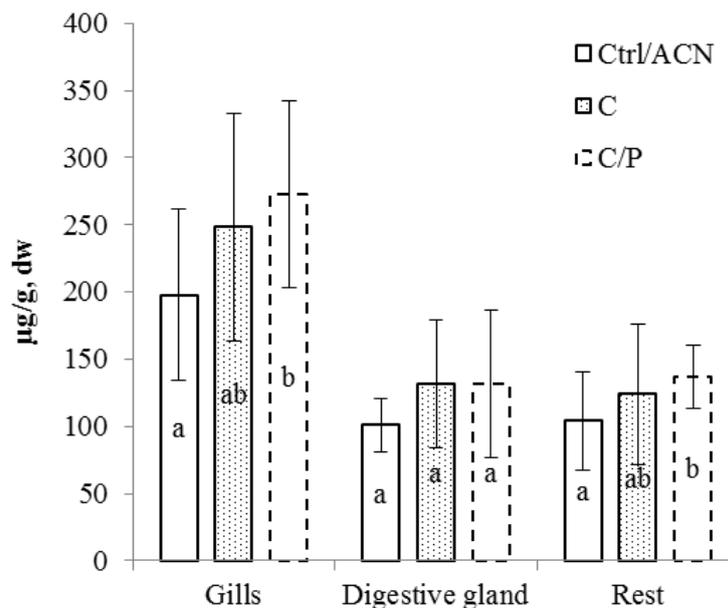


Figure 3: copper (Cu) mean concentrations in the gills, the digestive gland and the rest of the soft bodies (means \pm SD; n=15). Letters indicate significant differences between treatments in every organ according to the ANOVA ($p < 0.05$)

Gills present the most important metal concentrations with significantly higher values in the C/P treatment compared to the solvent control (273 $\mu\text{g/g}$, dw vs 198 $\mu\text{g/g}$, dw). Surprisingly, copper contaminated oysters did not exhibit any significant accumulation (248 $\mu\text{g/g}$, dw). The same tendencies were obtained in the digestive glands and the rests of the soft bodies but with lower values, ranging from 101 $\mu\text{g/g}$ dw in the digestive gland solvent control to 137 $\mu\text{g/g}$, dw in the rests of the mixed treatment (Figure 3). As previously observed in the gills, the bioaccumulation measured under the mixed treatment in the rests of the soft body was significantly higher than the solvent control. Finally, the experimental treatment did not induce any significant difference between the solvent control and the other conditions in the digestive gland.

3.2/ Metallothioneins concentration

An effect of the contamination was detected by the analysis of variance in the solvent free experimental units (Table 3). Concentrations were therefore averaged for the Ctrl, C and G/A conditions on the whole kinetic of exposure as previously done for the copper concentrations (Figure 4). Significantly higher concentrations were measured in the contaminated oysters compared to their control (17 and 20 vs 9 nmol Hg/g, fw). No other treatment effect was detected in the different exposed conditions in comparison with their respective control. However, the ANOVA highlighted a time effect in both of the studied organs for both the solvent free and solvent enriched EU. Only one interaction effect was noticed in the gills of the oysters sampled in the solvent enriched EU (Table3).

Table 3: Results of the two ANOVA performed to compare the effects of time and/or treatment on the MT concentrations in the gills and the digestive glands of the analyzed oysters. Solvent treatments: Ctrl, G/A and C; No solvent treatments: Ctrl/ACN, C/P, and P

Treatment	Organ	R ²	Factor	df	Mean squares	F	p
Solvent	Gills	0.488	Condition	2	26.259	0.627	0.54
			Time	2	426.308	10.178	<0.001***
			Interaction	4	132.730	3.169	0.025*
			Error		41.887		
	Digestive gland	0.351	Condition	2	106.111	0.977	0.386
			Time	2	398.860	3.674	0.035*
			Interaction	4	276.708	2.549	0.056
			Error		108.566		
No solvent	Gills	0.537	Condition	2	491.141	13.78	<0.0001***
			Time	2	166.152	4.662	0.016*
			Interaction	4	43.579	1.223	0.318
			Error		35.641		
	Digestive gland	0.438	Condition	2	379.994	2.199	0.126
			Time	2	1601.438	9.267	<0.001***
			Interaction	4	223.003	1.290	0.292
			Error		172.804		

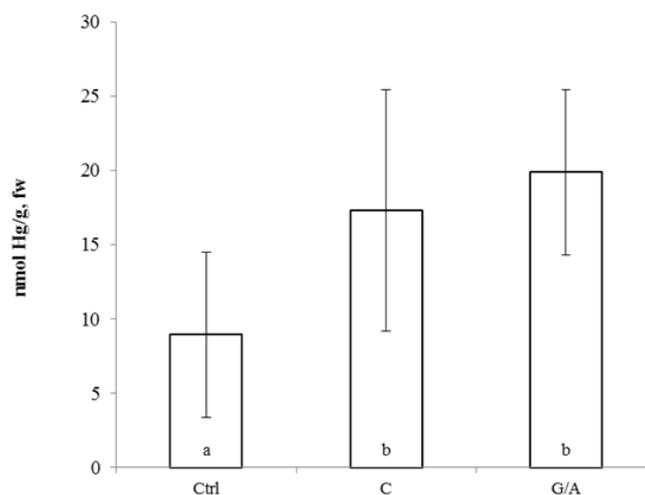


Figure 4: metallothioneins (MTs) means concentrations measured in the gills (means \pm SD; n=15). Letters indicate significant differences between treatments according to the ANOVA ($p < 0.05$)

3.3/Relative genic expressions

Table 4 and Table 5 present the calculated MFI in the gills and the digestive glands of the studied oysters for the 3 sampling times. The most important regulations observed after three days in the gills were observed for the mixed contamination with a down-regulation of *gpx* (0.42) and an induction of *cat* (1.77). An impairment of the metabolization process was detected after 7 days (*gst*: 0.30; *cyp1a1*: 0.29); it persisted until the end of the exposure (*cyp1a1*: 0.60). The C exposed oysters only exhibited an up-regulation of *cat* (3.17) after 3 days. The P experimental units presented an induction of *gst* after 3 days (2.12) and alternatively a repression (0.43) and an over-expression (5.98) of *sod* after 7 and 14 days. The G/A oysters were characterized by a repression of *cox1* from day 3 (0.35) to day 7 (0.39) and an induction of *cat* after 14 days (5.35).

Table 4: Mean Fold Induction of ten genes of interest in the gills of the sampled oysters

Metabolic function	Gene	G/A			P			C			C/P		
		T ₃	T ₇	T ₁₄	T ₃	T ₇	T ₁₄	T ₃	T ₇	T ₁₄	T ₃	T ₇	T ₁₄
Oxidative stress response	<i>gpx</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.42	/	/
	<i>sod</i>	/	/	/	/	0.43	5.98	/	/	/	/	/	/
	<i>sodmt</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>cat</i>	/	/	5.35	/	/	/	3.17	/	/	1.77	/	/
Detoxification system	<i>mt1</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>mt2</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>mxr</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Metabolization	<i>gst</i>	/	/	/	2.12	/	/	/	/	/	/	0.30	/
	<i>cyp1a1</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.29	0.60
Mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	0.35	0.39	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

/ = absence of significant difference between the expression levels of the contaminated condition and its respective control according to the Kruskal-Wallis test ($\alpha = 0.05$); *gpx*: glutathione peroxidase; *sod*: cytosolic superoxyde dismutase; *sodmt*: mitochondrial superoxyde dismutase; *cat*: catalase; *mt1*: metallothionein isoform 1; *mt2*: metallothionein isoform 2; *mxr*: multi-xenobiotic resistance; *gst*: glutathione-s-transferase; *cyp1a1*: cytochrome P450-1A1; *cox1*: subunit 1 of the cytochrome oxidase.

Table 5: Mean Fold Induction of ten genes of interest in the digestive glands of the sampled oysters

Metabolic function	Gene	G/A			P			C			C/P		
		T ₃	T ₇	T ₁₄	T ₃	T ₇	T ₁₄	T ₃	T ₇	T ₁₄	T ₃	T ₇	T ₁₄
Oxidative stress response	<i>gpx</i>	4.62	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>sod</i>	/	/	/	/	/	204.65	/	/	/	/	/	/
	<i>sodmt</i>	3.78	/	/	/	/	/	2.34	/	/	/	/	/
	<i>cat</i>	/	/	/	/	/	16.36	/	/	/	/	/	5.39
Detoxification system	<i>mt1</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>mt2</i>	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>mxr</i>	/	/	/	/	/	/	/	9.49	/	/	0.01	/
Metabolization	<i>gst</i>	4.66	/	/	/	/	3.33	3.78	/	/	/	/	/
	<i>cyp1a1</i>	/	/	/	/	/	/	0.35	/	/	0.17	0.21	/
Mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	/	/	0.39	/	/	/	/	/	/	/	/	/

/ = absence of significant difference between the expression levels of the contaminated condition and its respective control according to the Kruskal-Wallis test ($\alpha = 0.05$); *gpx*: glutathione peroxidase; *sod*: cytosolic superoxyde dismutase; *sodmt*: mitochondrial superoxyde dismutase; *cat*: catalase; *mt1*: metallothionein isoform 1; *mt2*: metallothionein isoform 2; *mxr*: multi-xenobiotic resistance; *gst*: glutathione-s-transferase; *cyp1a1*: cytochrome P450-1A1; *cox1*: subunit 1 of the cytochrome oxidase.

Digestive glands showed modulations of the oxidative stress response and the metabolization genes after 3 days: (1) *gpx*, *sodmt* and *gst* for the G/A exposure (4.62; 3.78 and 4.66) and (2) *sodmt*, *gst* and *cyp1a1* for the C exposed oysters (2.34; 3.78 and 0.35). Afterwards, the G/A oysters exhibited an inhibition of *cox1* after 14 days (0.39) and the C oysters showed an induction of *mxr* after 7 days (9.49). No transcriptomic response was detected in the digestive glands of the P oysters before 14 days of exposure. At this time, strong up-regulations were measured: *sod* (204.65), *cat* (16.36), *gst* (3.33). This organ presented in the C/P oysters a strong down-regulation of *cyp1a1* from day 3 (0.17) to day 7 (0.21). The *mxr* gene was then down-regulated too (0.01). At the end of the exposure, *cat* presented a significant up-regulation (5.39).

3.4/ Proteins differential expression

2-DE analysis was performed in order to detect protein differentially expressed (fold change > 1.5) in gills and digestive gland between T₀ and T₁₄ pesticide-exposed oysters. An average of about 300 distinct spots was detected for the gills (Fig.5 a and b), and 194 down-regulated and 5 up-regulated proteins. The total number of spots of the digestive gland gel was lower (an average of about 250 spots) but the number of differentially expressed proteins was higher with 36 proteins (including PTM of EC-SOD and retinal dehydrogenase 1) all down-regulated (Fig.5 c and d).

All these up and down regulated protein spots were excised from the gels and subjected to a proteolysis for peptides and proteins identification by HPLC-ESI-MS/MS and database search. Eight and 15 proteins differentially expressed were identified with reliable score and sequence coverage and all of them with *Crassostrea gigas* as taxonomy (Table 6). Regarding the down-regulation in the gills, non-selenium glutathione peroxidase was the most down-regulated (6.8 fold change) while the others

down regulated proteins had a fold change of about 2. On the other side, spot 10, where a hypothetical protein CGI-10006610 were identified, was the most up-regulated one (20.2 fold change).

Proteins down-regulation was much more contrasted in the digestive glands of P-exposed oysters. The highest (11.6 fold change) down-regulation was observed for one PTM form of EC-SOD, followed by spot 12 where carbonyl reductase 1 was identified, all PTM forms of retinal dehydrogenase 1 (4.9-6.9 fold change) and arginine kinase (5.6 fold change). The others proteins fold changes varied between 1.5 and 3.9.

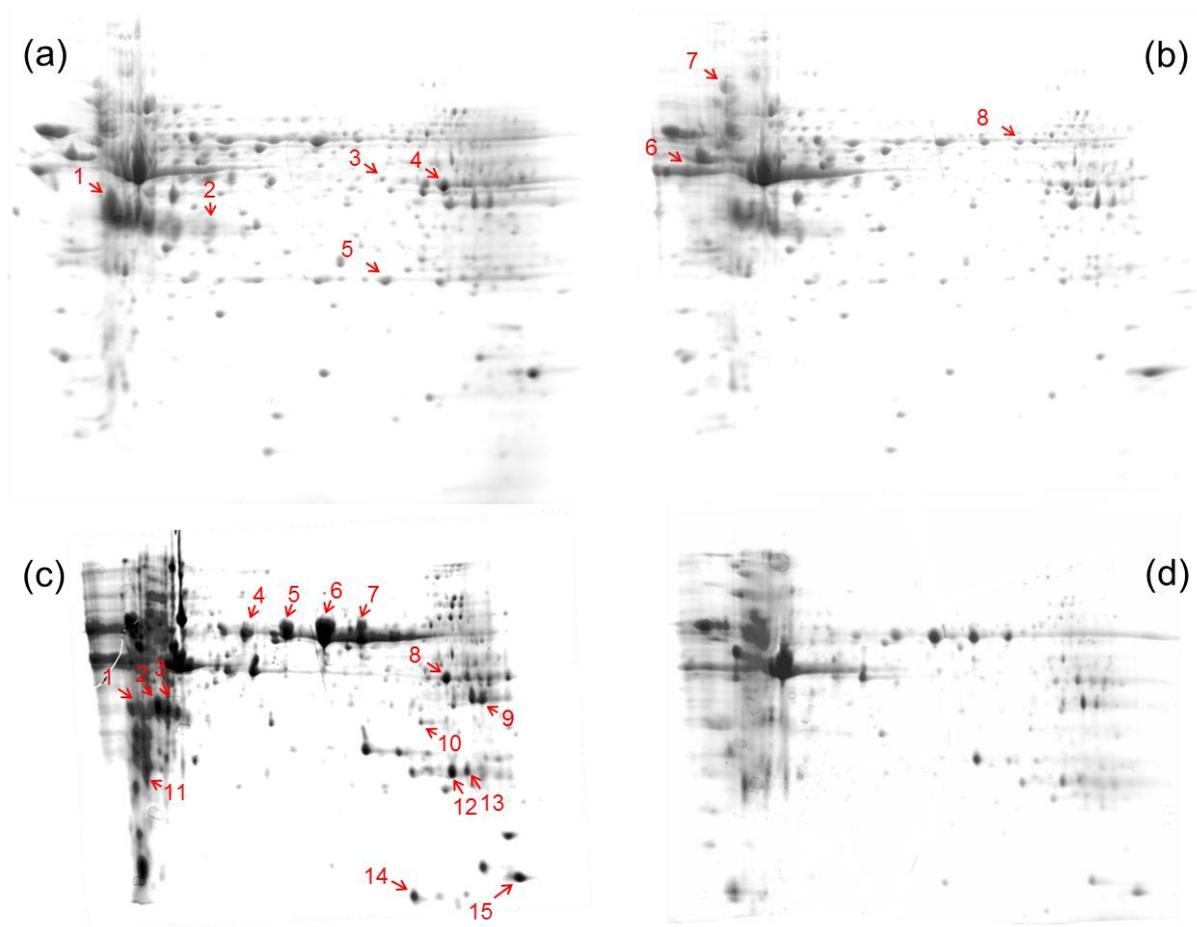


Figure 5: 2-DE gels of water-soluble proteins in the gills and digestive glands of *C. gigas* with (a) T_0 and (b) T_{14} exposed gills; (c) and (d) T_0 and T_{14} exposed digestive glands. The numbered proteins have been identified by HPLC-ESI-MS/MS and listed in Table 6.

Table 6. Proteins Identified in gills and digestive gland of pesticides-exposed oysters and bioinformation analysis (the taxonomy of all these proteins is *Crassostrea gigas*).

Regulation	Spot n°	Fold change	Accession n° ^a	Protein name	Identified peptides	Score ^b / Coverage	Biological process ^c	Molecular function ^c
Gills								
	1	2.8	gi 30039400	Cavortin	3	633 / 28%	-	Metal ion binding
	2	2.3	gi 405974348	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	4	633 / 47%	Superoxide metabolic process Oxidation-reduction process	Superoxide dismutase activity Metal ion binding
↓	3	1.9	gi 148717309	Hypothetical protein	21	1198 / 66%	-	-
	4	2.0	gi 44885729	Arginine kinase	28	2219 / 84%	-	ATP binding Kinase activity
	5	6.8	gi 405960313	Non-selenium glutathione peroxidase	12	392 / 69%	Oxidation-reduction process	Peroxidase activity Peroxiredoxin activity
	6	20.2	gi 405952370	Hypothetical protein CGI_10006610	10	570 / 34%	-	-
↑	7	2.1	gi 405959675	Heat shock protein HSP 90-alpha 1	36	1460 / 45%	-	-
	8	1.7	gi 405972837	Retinal dehydrogenase 1	27	861 / 44%	Metabolic process Oxidation-reduction process	Oxidoreductase activity
Digestive gland								
	1	11.6					Superoxide metabolic process	
	2	1.9	gi 405974348	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	4	166 / 47%	Oxidation-reduction process	Superoxide dismutase activity Metal ion binding
	3	1.8					Metabolic process	
	4	6.9						
	5	5.6						
	6	7.7	gi 405972837	Retinal dehydrogenase 1	13	2750 / 28%	Oxidation-reduction process	Oxidoreductase activity
	7	4.9						
	8	5.6	gi 44885729	Arginine kinase	7	278 / 34%	-	ATP binding Kinase activity
	9	3.1	gi 405957058	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	6	461 / 39%	Glucose metabolic process Oxidation-reduction process	Oxidoreductase activity
			gi 405973892	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	21	914 / 89%	-	-
↓	10	8.1	gi 405964308	Carbonyl reductase [NADPH] 1	5	259 / 23%	Oxidation-reduction process	G-protein coupled receptor activity Oxidoreductase activity
			gi 405968755	Mammalian ependymin-related protein 1	7	628 / 12%	Cell-matrix adhesion	Calcium ion binding
	11	1.5	gi 405974628	Calcium-dependent protein kinase isoform 2	6	177 / 30%	-	Calcium ion binding Kinase activity
			gi 405971643	Proteasome subunit beta type-3	3	165 / 29%	Proteolysis involved in cellular protein catabolic process	Threonine-type endopeptidase activity
	12	2.6	gi 405958751	Cathepsin L	5	238 / 29%	Proteolysis	Cysteine-type peptidase activity
			gi 405958751	Cathepsin L	5	166 / 29%	Proteolysis	Cysteine-type peptidase activity
	13	1.6	gi 405966618	Carbonic anhydrase 2	4	153 / 22%	-	Carbonate dehydratase activity Zinc ion binding
	14	-	gi 405961012	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	6	446 / 56%	Superoxide metabolic process	Superoxide dismutase activity Metal ion binding
	15	3.9	gi 48476115	Cyclophilin	12	1344 / 70%	-	-

^a NCBI accession number; ^b Mascot score; ^c GO analysis based on EMBL-EBI database.

4/ Discussion

One of the main characteristics of this experimentation was the use of contaminants cocktails at environmentally relevant concentrations. This work constituted then a good complementary approach to field studies previously performed.

4.1/ Variations of the copper accumulation in the presence of pesticides

Copper accumulation presented interesting results indicating a potential interaction between metal and organic compounds. The mixed treatment only presented a significant Cu accumulation (Fig. 3). Interactions between copper and organic compounds such as pesticides or antibiotics have already been shown (Park et al., 2007; Sekar et al., 2013; Trinelli et al., 2013), and confirm the possibility for the metal to complex with the studied contaminants. Copper is actually known to interact with organic ligands in salt water, where 89 to 99% of the total dissolved copper is organically complexed (Kiaune and Singhasemanon, 2011), potentially reducing its deleterious effects (Buck et al., 2007). However, organically complexed copper seems to be less available (Absil et al., 1996; Inaba and Takenaka, 2005). Adsorption of Cu-pesticides complexes on biological membranes might then explain our observations as it was previously described with Cu-glyphosate on *Ulva lactuca* (Trinelli et al., 2013). This hypothesis is reinforced by the presence of mucus on the gills, which is a privileged site of adsorption for metals (Tao et al., 2001). We cannot however exclude the possibility of a direct contamination by ionic copper Cu^{2+} or a minor metal transfer from the digestive gland, although no food was used here. Actually, our results are consistent with a direct route of exposure as significant accumulation was measured in the gills and in the rests of the soft body, but not in the digestive gland.

The absence of pesticides in the C condition and the use of artificial sea-water may be at the origin of a lower level of organic ligands in comparison to the C/P treatment. The bioavailable ionic form of Cu is therefore supposed to prevail in comparison to the organically complexed form. This hypothesis should imply a stronger internalization of the metal in the C treatment, although it was not significantly present in the sample.

4.2/ Effect of copper at environmental level

The significant MTs concentrations in the gills of the solvent free treated oysters confirm the direct pathway of contamination. This observation was expected and confirms the roles of MTs concerning metal regulation (Capdevila et al., 2012), underlying the adaptive response of the oysters. Copper has been known to increase MTs levels for a long time (Mosleh et al., 2006; Ringwood et al., 1998), but rarely at such low levels of contamination. The low concentration applied here is probably a cause of the non-significant accumulation of the metal in the C condition, additionally to the high regulation of this essential metal (Balamurugan and Schaffner, 2006; Festa and Thiele, 2011; Puig and Thiele, 2002). Some authors have also highlighted a potential role of mucus in metal depuration (Sze and Lee, 1995) potentially contributing to copper excretion.

The relative gene expressions present moderate modulations of expressions facing Cu alone. Although a direct pathway of contamination was highlighted, the most significant responses were observed in the digestive gland, highlighting a tissue specific reaction. The stimulation of *cat* gene involved in H₂O₂ metabolization in the gills indicates an adaptive response facing oxidative stress, which is consistent with this enzyme role (Rocher et al., 2006) and the potential presence of copper-induced reactive oxygen species (ROS). The digestive gland presented also moderate regulations at the mitochondrial level with the up-regulation of *sodmt* gene, involved in the transformation of superoxyde anion into H₂O₂. Metabolization of xenobiotics seems to be affected in the same way through the induction of the phase II enzyme GST. This protein is involved in the conjugation of xenobiotics with glutathione (GSH) and presents various isoforms in the oysters (Boutet et al., 2004a). It's up-regulation could be associated then to (1) the conjugation of Cu with GSH or (2) to the conjugation of GSH with ROS produced by Fenton reaction (Balamurugan and Schaffner, 2006). Those observations are in accordance with the late up-regulation of phase III *mxr* gene after 7 days. Concomitant activities of *gst* and *mxr* systems have already been observed with bivalves (Pain and Parant, 2003) and the response of *mxr* facing metal contamination is consistent with previous studies on *Corbicula fluminea* (Achard et al., 2004). The absence of observable induction concerning the *mt* genes although significant levels of proteins were measured could be due to an early induction of the genes before the first sampling time at 3 days. These observations are in accordance with the hypothesis of an early adaptive response and with the absence of gene modulations at 14 days of exposure. In conclusion, Cu did not present a real toxicity at this environmental dose, but induced an adaptive response. This hypothesis is corroborated by the “oysters’ history”. We can suppose that these adults animals originating from the bay were already adapted at these levels of contamination, explaining partially the low biological responses observed.

4.3/ Biological response facing Glyphosate and AMPA

The G/A exposure induced similar levels of biological response but the affected genes were different. MTs were significantly detected, but the probability of a glyphosate or AMPA sequestration by this protein is very low, mainly because of steric hindrance. However, the specificity of action of this protein have been widely discussed, and it is known that MTs play a key role in ROS scavenging (Anderson et al., 1999; Ruttkay-Nedecky et al., 2013). An early expression explains probably the absence of significant *mt* gene expression after 3 days of treatment. Indeed, gene modulations facing contaminants occur quickly as it was observed after only 1 day of exposure to metals for the earthworm (Fisker et al., 2013) or *Crassostrea virginica* (Roesijadi et al., 1997). Whereas mRNA half-life is known to be short, proteins like MTs can present a turnover of several days depending on the contaminant and the species (Ng et al., 2007), explaining therefore the presence of the protein but the absence of gene modulation. The only affected gene in the gills after 3 and 7 days is *coxI*, coding for the subunit I of the cytochrome c oxidase (complex IV of the oxidative phosphorylation). Such observations suggest a deleterious effect upon mitochondrial metabolism. This statement is inconsistent with previous observations made on rat mitochondria (Peixoto, 2005). However, this

herbicide was proved to induce oxidative stress on human mitochondria through ROS production (Heu et al., 2012), which is in accordance with the MTs data. This organelle is indeed known to be the main ROS production site in the cell (Srinivasan and Avadhani, 2012) and different theories have been documented concerning the regulation of the cytochrome c oxidase facing this type of stress. A diminution of COX activity and the subsequent slowing of the electron transfer have already been described as a response to oxidative stress by decreasing ROS production (Arnold, 2012). The down-regulation observed in our study could be then interpreted this way, which is consistent with the observations made in the digestive gland. *Gpx* and *sodmt* up-regulations indicate clearly an oxidative stress mainly located in the mitochondria. *Gst* up-regulation on the other hand, surprisingly highlights a potential presence of contaminant in the cytosol as its role is to conjugate it with glutathione (Hermes-Lima, 2004).

The end of the exposure is characterized by transient genic modulations, underlying a dynamic adaptive response of the organisms. The toxicity mechanisms remain unclear, especially as Glyphosate and AMPA are known to be very hydrophilic compounds (Schuette, 1998). Moreover, their size does not facilitate the absorption through biological membranes. Then, their chemical properties might explain the very low effects observed in our study, as well as in other works on the oysters at both larval (Mottier et al., 2013) or mature stages (Tanguy et al., 2005) and on the oyster gametes (Akcha et al., 2012). Despite the fact that the concentration applied in our experiment is based on environmental observations, the level remains higher compared to these studies. We can therefore reasonably conclude to a very low toxicity of this compound toward oyster physiology in its pure form. The potential toxicity of commercial formulations however should be studied as well.

4.4/ Pesticides cocktails effect

Interestingly, the P exposure presented very strong modulations at the end of the experiment, especially in the digestive gland. These up-regulations are typical of an adaptive response and consistent with the metabolic pathway involving *sod*, *cat* and *gst*, implying ROS production. Pesticides in cocktails or used alone have already proved their toxicity towards oysters with different bioindicators such as (1) relative gene expressions (Tanguy et al., 2005), (2) genotoxicity essay (Akcha et al., 2012), (3) or flow-cytometry analysis (Gagnaire et al., 2007). Embryo stages and gametes were studied as well and proved to be far more sensitive than mature oysters facing pesticides exposures, regarding genotoxicity and embryotoxicity (Mai et al., 2013, 2012).

Proteomic data were produced as a complement to gene analyses in order to investigate the effect of the applied cocktail over time. The effect of exposure to pesticides is more pronounced for digestive glands than for gills' proteome. This might be explained by the transfer of these organic compounds from the gills to the digestive gland where they might be accumulated or metabolized (Katagi, 2010). Subsequent inhibitions of proteins synthesis and DNA damages were suggested by others (Mai et al., 2012; Weisshaar and Böger, 1987). Furthermore, proteins the most differentially expressed such as non-selenium glutathione peroxidase, retinal dehydrogenase 1, Cu/Zn SOD, cavortin and carbonyl

reductase 1 are involved in oxido-reduction processes. The down regulation of these proteins may indicate that the oxidative protection mechanism was hampered due to an overproduction of ROS in the presence of pesticides. The down regulation of proteins whose function is related to oxidative stress has been reported for *Saccostrea cucullata* exposed to dimethoate (Guo et al., 2012). Moreover, ROS are very likely to bind with cellular components such as proteins (Goetz and Luch, 2008). Subsequent oxidation may lead to conformational changes and lead to their degradation, explaining therefore the down regulations observed here. Finally, the slight down-regulation of two proteases (i.e. proteasome subunit beta type-3 and cathepsin L) essential for cellular processes such as cell cycle and response to oxidative stress, demonstrates the toxicity enhanced by pesticides exposure which might lead to the cell death. To summarize, although a role of the solvent cannot be totally excluded, the proteomic data are in accordance with the observations made at the gene level and suggest that the pesticides cocktail can affect the biological functions of the cell through oxidative stress. We can indeed hypothesize that the recorded up regulations at the gene level are an adaptive response of the cell facing the strong impairment of the antioxidant system at the protein level, notably in the digestive gland.

4.5/ Interaction of copper and pesticides and the associated biological effects

Finally, the C/P exposure highlighted the interactions mentioned earlier at the gene level. The observed responses in the mixed treatment present common features with the P and C exposures, but unique characteristics as well. Oxidative stress response is induced in both C and C/P gills, but the *gpx* repression of the mixed exposure might indicate a stronger effect of the contaminants. Down-regulations of the antioxidant system can paradoxically be a symptom of oxidative stress, as the enzymes involved and their mRNA are sensitive to ROS (Fujii and Taniguchi, 1999) as evidenced before through proteomic approach. For the same reasons, down-regulations of the detoxification system and metabolization process are observed in the mixed treatment for both of the studied organs.

Despite the oxidative stress mentioned earlier, no MTs response was observed in the C/P exposed oysters, as well as in the P exposed. This observation can be potentially explained by the high MTs levels observed after 3 days of exposure in the gills of the Ctrl/ACN (data not shown). These concentrations led to a significant “interaction effect” and potentially contributed to mask an MTs induction by the pesticides or the mixed treatment. This potential effect of ACN on the MTs level was unexpected and inconsistent with the gene data analyses. The use of carrier organic solvents in aquatic ecotoxicology is common but no data were available concerning ACN (Hutchinson et al., 2006). However, preliminary studies on 7 days did not highlight solvent effect at 0.07% of ACN. It is then very likely that the experimental conditions slightly disturbed the MTs response, as these proteins are known to be induced by general stress.

5/ Conclusion

To conclude, this study presents original features such as the use of a complex pesticides cocktail (8 molecules), and the study of its interaction with an inorganic contaminant: copper.

We were able to identify moderate biological responses facing the applied contaminations. Clear interaction effects between copper and pesticides were highlighted through different biological responses at the protein and the gene level. The organic compounds seemed to amplify the metal accumulation, but further studies are needed to conclude on its localization (in the cell or adsorbed). The mix of the cocktail and the metal induced an oxidative stress mainly characterized by gene repressions, whereas the isolated contaminants led to adaptive responses with up-regulations of antioxidant functions.

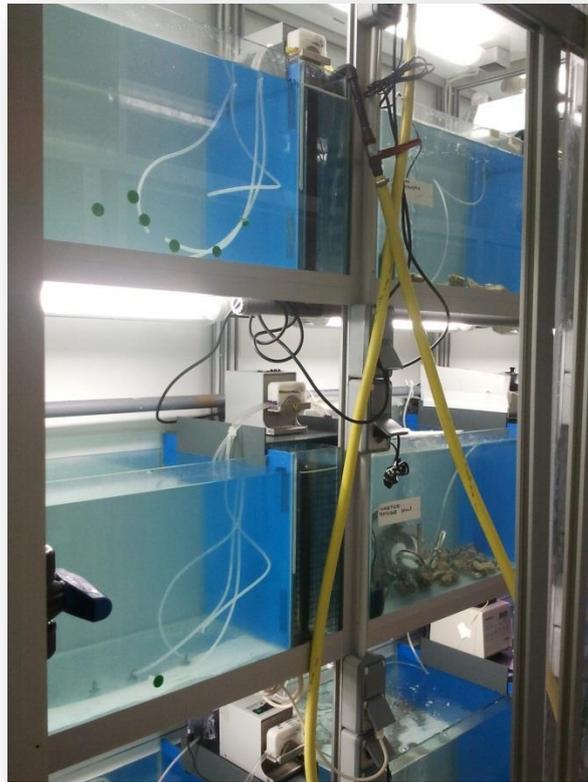
Biological responses depended then on the treatment and were tissue specific. The low levels of response observed were mainly attributed to the environmentally relevant levels of contamination applied.

The glyphosate and its degradation product presented moderate biological effect too, although their concentrations in water were largely higher than the other contaminant's. These observations are probably in association with their very high hydrophilic properties. The biological responses were mainly focused on the mitochondrial metabolism through ROS production and underline the low toxicity of these compounds at environmental levels towards mature oysters. Attention should rather be paid to the commercial formulations as their additives are likely to improve biological membranes crossing.

Although oysters' response was identified, the toxicity mechanisms remain unclear. A better understanding of the process implied in the contamination, the metabolization, the induced ROS production and the contaminants reactivity is necessary to fully apprehend the toxicity of contaminants cocktails. Such questions could be answered by more mechanistic approaches, and by the use of complementary tools in analytical chemistry and metabolomics. These domains are indeed well adapted to understand the fate of the contaminants from both chemical and biological points of view. This work represents however a good completion to previous studies concerning phytosanitary products' toxicity toward oysters and may help to better understand the oyster-farming crisis occurring in the Arcachon bay.

6/ Acknowledgements

The ANR, RIPOST, the regional project OSQUAR, the SIBA are thanked for their financial support, so as the FEDER (This project is co-financed by the European Union with the European fund of regional development). The CPER A2E and the Region Aquitaine are thanked too for their support in financing the analytical equipment.



3. Effets biologiques d'un cocktail de HAPs administré par voie trophique chez *C.gigas* : rôle de la ploïdie

3.1. Contexte de l'étude

Comme spécifié précédemment, la représentativité de notre approche expérimentale est avant tout conditionnée par le choix de contaminants pertinents. La présence dans le bassin d'Arcachon des HAPs a été mise en évidence depuis longtemps, aussi bien dans les sédiments que dans l'eau, les particules ou le *biota* (Abou Mrad, 2011; Baumard et al., 2001, 1998a; Crespo, 2009; Devier et al., 2005). De plus, cet hydrosystème est une zone hautement touristique caractérisée par des pics de fréquentation en été, ce qui se traduit par une activité nautique accrue (Le Berre et al., 2010). Ces pratiques sont susceptibles d'amplifier les rejets de contaminants associés : pesticides antisalissures (peintures des coques des bateaux) et HAPs (moteurs).

Les approches de terrain menées en 2012, avaient pour objectif d'étudier l'effet de la reproduction sur la physiologie des huîtres en été par l'emploi d'organismes diploïdes et triploïdes au niveau d'une station non contaminée par les HAPs : Arguin. La transplantation d'organismes similaires au niveau de sites plus impactés tels que l'Île aux oiseaux et le Tès ont permis de mettre en évidence une contamination différentielle, et d'étudier l'effet de ces polluants emblématiques de la période estivale sur les huîtres. Il s'est avéré que l'effort de reproduction des organismes triploïdes étudiés sur le terrain était loin d'être négligeable. Il nous a donc été difficile de discriminer l'effet des polluants de celui de la reproduction, même par l'utilisation d'organismes supposément stériles.

Cette nouvelle expérimentation en conditions contrôlées se positionne donc comme un complément de ces travaux *in situ*. Nous avons travaillé en février 2013 avec des organismes en fin de période de repos, présentant une gamétogenèse nulle. Il nous a ainsi été possible d'évaluer l'effet des HAPs sans le biais lié à la gamétogenèse, sur des organismes similaires à ceux employés sur le terrain.

La voie de contamination choisie correspond aux observations faites *in situ*, en lien avec l'hydrophobicité de cette famille de contaminants : la voie trophique. Un effort particulier a été fourni pour administrer quotidiennement des doses théoriques de micro-algues contaminées par un cocktail représentatif qualitativement et quantitativement des concentrations en HAPs retrouvées sur les particules de la lagune.

Les questions sous-tendues par cette approche sont :

La contamination en HAPs du bassin d'Arcachon présente-t-elle une réelle toxicité pour les huîtres adultes ?

Dans un contexte de mortalités estivales inexpliquées, la triploïdie des huîtres représente-t-elle un avantage face à une contamination aux HAPs ?

3.2. Principaux résultats et conclusions

La contamination des huîtres a eu lieu par voie à la fois dissoute (composés légers) et trophique (composés lourds) comme illustré dans la Figure 91. Une contamination différentielle entre diploïdes (2n) et triploïdes (3n) a de plus été mise en évidence : les triploïdes présentent une bioaccumulation totale plus importante avec des gains de concentration pour chaque HAP dans les branchies. Les diploïdes à l'inverse se caractérisent par une absence d'augmentation de la contamination totale, et par des diminutions de concentration des composés les plus présents dans les tissus (fluoranthène, pyrène, chrysène, benzo(b)fluoranthène). Ces contaminants sont par ailleurs ceux dont les gains de concentration sont les plus faibles chez les triploïdes (Figure 91). Cela peut être mis en lien avec une prise en charge plus efficace et rapide par les systèmes enzymatiques des composés les plus présents dans la cellule, ce qui corrobore l'hypothèse de la métabolisation. Ce type de processus bien décrit chez les poissons, est réputé marginal chez les mollusques tels que l'huître. Nos travaux semblent pourtant indiquer la présence de tels mécanismes chez *C. gigas*, bien que le dosage des métabolites eut été le moyen le plus sûr le confirmer.

De manière contre-intuitive, un effet toxique a été détecté chez les triploïdes de par l'inhibition des réponses antioxydantes au niveau transcriptomique (Figure 91 : *gpx*, *cat*, *sodmt*, *coxI*, *gst*). Ce modèle biologique est pourtant connu pour allouer préférentiellement son énergie à la croissance au détriment de la reproduction, ce qui n'est pas sans rappeler les profils décrits chez des lignées résistantes aux mortalités estivales par Samain en 2011 (Samain, 2011). Les travaux de Gagnaire en 2006 (Gagnaire et al., 2006) ont par ailleurs déjà souligné des mortalités estivales inférieures chez les triploïdes, ce qui laisse présager d'une capacité antioxydante potentiellement supérieure de la part de ces organismes face au stress.

Nos résultats semblent donc indiquer par leur contamination supérieure que les triploïdes présentent des caractéristiques favorisant la bioaccumulation des HAPs (taux de filtration ou de lipides supérieurs). Ces organismes montrent de plus une sensibilité supérieure à la contamination appliquée ce qui peut être mis en lien avec une production accrue de métabolites toxiques (compétition entre la bioaccumulation et la métabolisation).

L'allocation d'énergie différentielle des organismes triploïdes pourrait donc présenter un avantage en termes de croissance mais à l'inverse un désavantage face à des contaminants dont la toxicité est directement conditionnée par leur intensité de métabolisation (activation).

Cette hypothèse est renforcée par l'étude de l'histoire des organismes. Il est en effet probable que les organismes diploïdes utilisés ici, issus du bassin d'Arcachon, aient hérité d'une certaine « résistance » face à une contamination environnementale typique de leur milieu d'origine telle que nous l'avons appliquée (mécanismes épigénétiques). Les organismes triploïdes n'étant pas issus d'une reproduction dans le milieu naturel, ils n'ont pas pu bénéficier de ce type d'avantages, ce qui corrobore l'hypothèse selon laquelle les triploïdes peuvent présenter une fragilité supérieure face à la pollution.

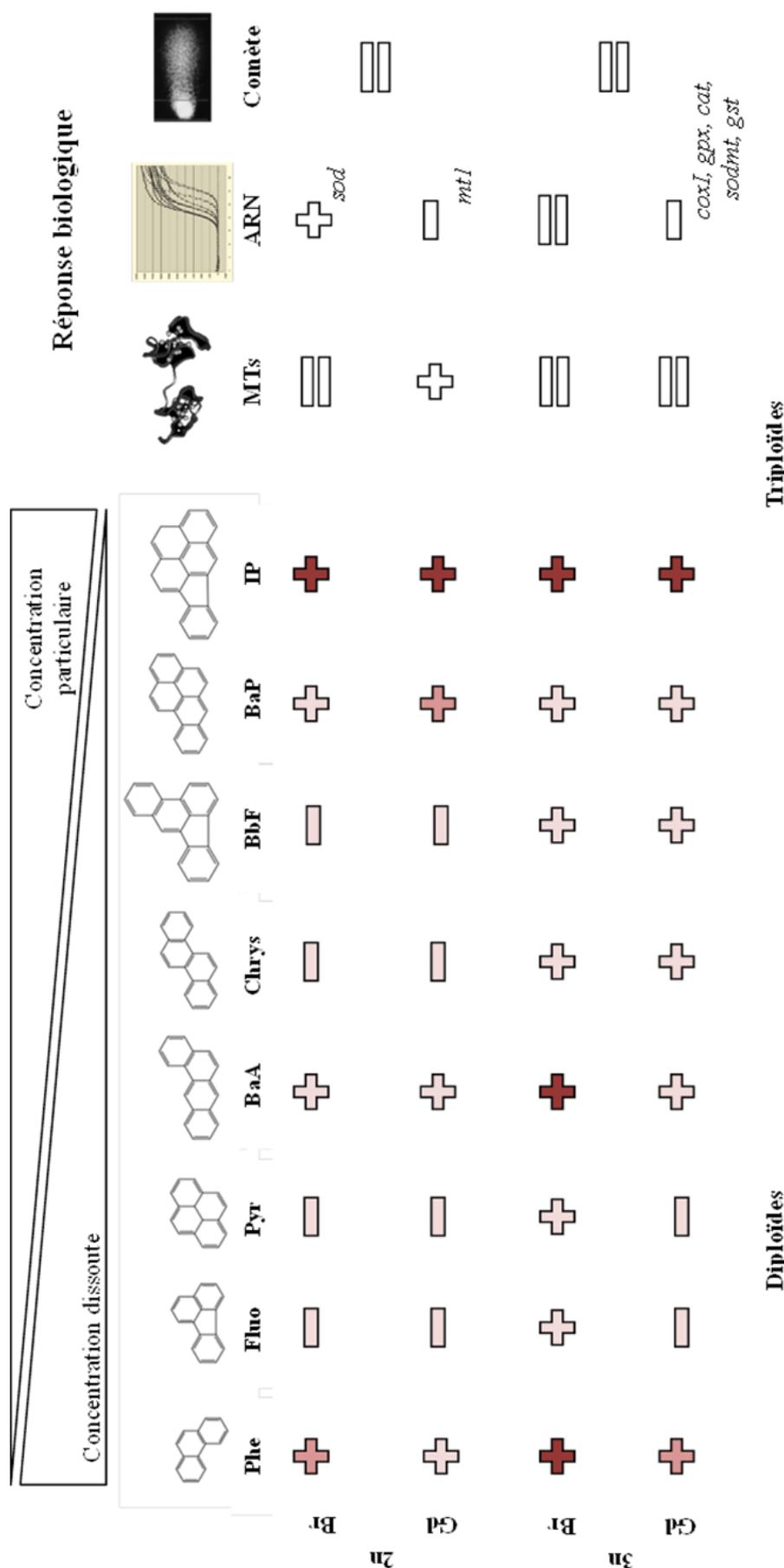


Figure 91 : Schéma récapitulatif des principaux résultats et conclusions extraits de l'étude de la contamination en HAPs et de ses effets chez des huîtres diploïdes et triploïdes.

Les symboles mathématiques indiquent les augmentations, diminutions ou absence d'évolution concernant les paramètres mesurés. Les nuances de couleurs pour la bioaccumulation permettent de discriminer les variations de 0 - 40% (clair) ; 40 - 80% (medium) ; > 80% (foncé). Pour les données de génétiques, le/les gène(s) concerné(s) sont indiqués.

Les diploïdes utilisées lors de cette étude n'ont en effet montré aucune modulation génique face à la contamination, ce qui indique des niveaux métaboliques de base suffisants pour se défendre. La seule réponse observée est une augmentation des MTs (Figure 91). La production de ces protéines chaperonnes peut être liée à une réponse adaptative face à un léger stress oxydant (EROs produites suite à la contamination par les HAPs).

Nos travaux présentent donc ici un bon complément des études menées sur le terrain décrites précédemment dans ce manuscrit. Les huîtres triploïdes utilisées alors ont montré un effort de reproduction non négligeable qui a pu interférer avec leur réponse face à une contamination en HAPs. En travaillant durant la période de repos en février, nous avons pu dans le cadre de cette expérience, nous affranchir de ce biais afin d'étudier l'effet simple des contaminants.

Il convient cependant de préciser que les conclusions émises à la suite de ces travaux sont des hypothèses nécessitant confirmation. Les biomarqueurs choisis ne permettent pas de discuter les niveaux métaboliques des organismes étudiés, et bien que certains indicateurs (Figure 91 – 3n Gd : diminution des concentrations de Fluo et Pyr) semblent aller dans le sens d'une métabolisation plus importante chez les triploïdes, nous ne pouvons l'affirmer de manière catégorique. Les informations tirées de la littérature sont en accord l'hypothèse d'un métabolisme plus actif chez les triploïdes mais sont issues de travaux ayant été réalisés durant la période de reproduction qui est critique pour les diploïdes.

Ces résultats invitent donc à de nouvelles expérimentations avec ces deux modèles biologiques associées à un suivi rigoureux de la métabolisation des contaminants, des activités enzymatiques associées et des taux de filtration. L'étude des taux lipidiques serait également un indicateur pertinent au regard de l'hydrophobicité de ces contaminants. Notons que notre objectif était de mener une contamination essentiellement par voie trophique. Or nos résultats montrent qu'une partie des polluants utilisés est restée sous forme dissoute, ce qui laisse présager de potentiels effets associés à une contamination « multi-voies » non discutés ici. Ce point mériterait une attention très particulière puisque ces phénomènes d'exposition selon différentes voies sont présents dans la nature ; la pertinence de tels travaux est donc particulièrement importante.

Finalement, il semblerait intéressant de reproduire ce type d'expérience avec les mêmes modèles biologiques présentant des degrés divers de développement gonadiques comme cela a été réalisé par Béguel et collaborateurs (Béguel et al., 2013). Ce type de travaux nous aiderait à comprendre l'effet de la gamétogenèse sur la réponse face aux polluants et l'interaction entre ces deux processus.

3.3. Article: Response of the cultivated oyster facing an environmentally relevant PAH contamination; a laboratory approach based on the Arcachon bay case

Status: to submit

Hugues BIJOUX, Hélène BUDZINSKI, Bénédicte MORIN, Magalie BAUDRIMONT, Patrice GONZALEZ*

Université de Bordeaux, UMR EPOC 5805, teams LPTC and EA

* Corresponding author. Tel.: +33 5 56 22 39 21; +33 5 56 54 93 83.

E-mail address: p.gonzalez@epoc.u-bordeaux1.fr (P. Gonzalez).

Keywords: Crassostrea gigas, Arcachon bay, PAH, Trophic route, Oxidative stress; Triploid

Abstract

The Arcachon bay is one of the most important oyster-farming sites in France. This activity has however been jeopardized by recurrent summer mortalities episodes concerning juveniles and adults organisms. Among several factors potentially involved in these events, a role of the chemical contamination was suspected and field studies led to the detection of a significant PAH (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) contamination. In order to overcome the biological consequences of the reproduction processes, a laboratory study was set-up during 21 days with diploid and triploid oysters. The contamination was designed to be qualitatively and quantitatively representative of the field situation, implying a mixed dissolved and trophic pathway of contamination. The biological response of *C.gigas* facing PAH was assessed by bioaccumulation measures of the studied compounds in the gills and the digestive gland. The production of metallothionein was studied and the expression levels of 10 genes involved in general stress response was evaluated by RT-qPCR. Our study exhibited differential responses between the two studied models. Triploid oysters showed a higher PAH accumulation and stronger deleterious effects at the gene expression level after 21 days of exposure. These observations were attributed to potential differences in feeding behavior and metabolic rates between the diploid and the triploid oysters. A role of the animal history was also suspected. Triploidy is generally assumed to represent an advantage concerning survival because of limited energy allocation to reproduction. Our study on the contrary, seems to exhibit a disadvantage of the triploid oysters facing PAHs during the resting period.

1/ Introduction

The economic importance of coastal ecosystems as highly productive areas is well admitted (Newton et al., 2013). The induced attractiveness of these areas can therefore be at the origin of ecological degradations. Such observations were made in the case of the Arcachon bay, a semi-enclosed lagoon in the south-western of France. This bay is indeed the final recipient of several rivers draining a watershed of 4138 km² (Auby et al., 1999) mainly dominated by agriculture and urbanized areas. The growing anthropic pressure exerted on this natural ecosystem is therefore associated to demographic expansion, tourism, agriculture and industry to a lesser extent.

The ecological degradation of the bay was evidenced by several observations such as the drastic diminution of the *Zostera noltei* sea grass bed surface (Plus et al., 2010) during the last 10 years. The Arcachon bay is also renowned as one of the major oyster-farming site in France (*Crassostrea gigas*), and an important natural spat provider. The sustainability of this major economic activity is however questioned. Recurrent summer mortality events of juveniles and adults oysters were registered during the last 10 years (Cochennec-Laureau and Baud, 2008). Subsequent research programs pointed out the potential role of the chemical contamination of the bay as an aggravating factor in these mortality events (Soletchnik et al., 2007).

An intense monitoring was therefore set up through local research programs in order to identify the major contaminants of the bay. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were detected in the different studied compartments (sediment, particles, oysters, water) and their anthropic source was confirmed (Crespo, 2009). The toxicity of PAH toward marine organisms is well documented (Bado-Nilles et al., 2008; Jørgensen et al., 2008; Wootton et al., 2003), justifying our interest for these compounds.

The study of these contaminants is even more relevant in the Arcachon bay, which is particularly concerned by tourism issues and associated water sport activities during summer (Ifremer and LPTC, 2008; Le Berre et al., 2010). However, these activities principally take place during the reproduction period of the oyster, which is critical because of energy allocation issues (Enríquez-Díaz et al., 2008). The potential interactions between these biological processes and a typical summer contamination were investigated through previous field studies. Triploid oysters were then used as “control” because of their limited reproduction effort in comparison to diploids.

As field studies are very representative but challenging in the interpretation, it seemed relevant to adopt a complementary mechanistic approach through laboratory. Our main objective was therefore to investigate the biological effect of PAHs on an emblematic species of economic importance: *Crassostrea gigas*. This experimentation was achieved in February to avoid a disruption of the biological response by the reproduction process. In order to achieve a representative field contamination, a specific cocktail of 8 different compounds was realized and adsorbed onto micro-algae as phytoplankton seemed to be one of the major PAH source for oysters in the bay (unpublished data). Triploid oysters were also challenged in this work as they were used in our previous field studies and represent an alternative of economic interest to traditional oyster-farming. Metallothioneins production and relative gene expression of 10 genes involved in stress response were

studied in the gills and the digestive glands of the organisms. The 8 PAH bioaccumulation was also measured in these organs.

2/ Materials and methods

2.1/ Experimental design

Four glass experimental units (EUs) of 40L filled with artificial sea water (32 psu) were used during the experimentation (Fig. 1). Artificial sea water was prepared regularly and stored in a tank before manual renewal of the EUs water every two days. Adult-sized diploid and triploid oysters were equitably allocated in the four EU for a 14 days acclimation: diploids control (2n Ctrl), diploids exposed to PAH (2n PAH), triploids control (3n Ctrl), triploids exposed to PAH (3n PAH).

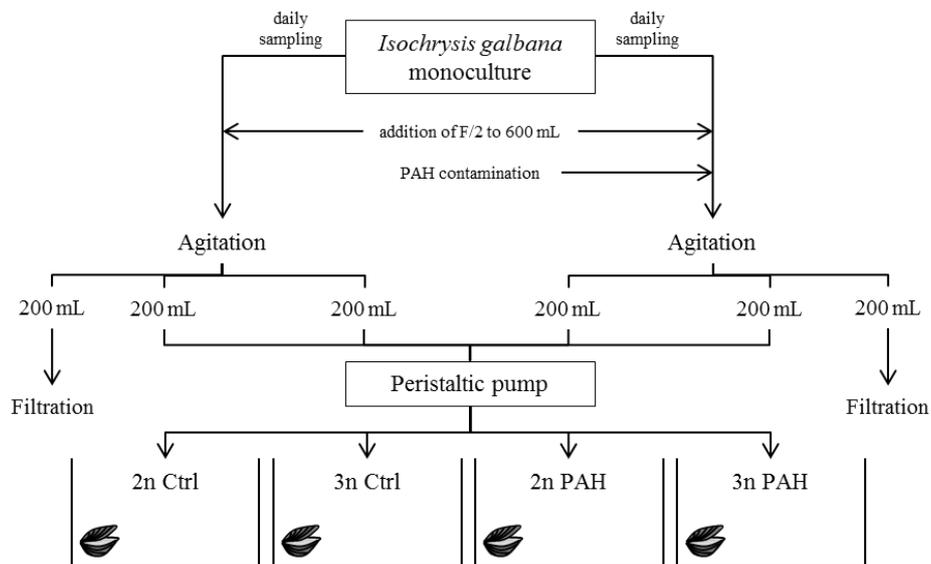


Figure 1: Schematic representation of the experimental set-up and the feeding strategy adopted in our study.

Temperature of the EUs was set-up at 15°C and an alternation of 12h/12h of dark and light was respected. No significant differences were detected between the total masses of the organisms (shell mass + soft body mass) at day 0.

Fifteen individuals were sampled in every EU at day 0, day 7 and day 21. They were dissected in order to separate gills and digestive glands from the rests of the soft bodies. Organs were weighted and shells were weighted and measured after drying for 5 of the 15 sampled individuals at every sampling time. Samples of gills and digestive glands were conserved for genetic analyses in microtubes filled with RNA-latter at -80°C. The same samples were prepared for metallothionein analyses and stored under nitrogen atmosphere at -80°C. Finally, facing the important needs of biological material for PAH analyses, pools of gills and digestive glands were prepared from the 10 remaining oysters at every sampling time. These samples were stored at -20°C in aluminum containers and freeze-dried prior to analyses.

2.2/ Feeding strategy

Isochrysis affinis galbana was used to feed the organisms during the totality of the experiment. A theoretical daily quantity of ingested cells was evaluated to $48.5 \cdot 10^6$ cells/oyster (~ 1 mg of dry mass per oyster); the calculation was based on: (1) a mean clearance rate of *Crassostrea gigas* (2 L/h/g, dw) (Barillé et al., 1994; Bougrier et al., 1995; Haure et al., 2003); (2) the mean dry weight of the studied oysters (~ 1 g); (3) a mean daily time of shell opening of 6h (Mat et al., 2013) and (4) the mean summer concentration of phytoplankton (400 000 cell/L) in the Arcachon Bay (Pouvreau et al., 2012).

Cellular density of an *Isochrysis* mono-culture was daily evaluated with a Nageotte chamber, and 2 subsequent samplings of microalgae were performed: one for the control EUs and one for the contaminated ones (Figure 1). The volume of the two samples was previously calculated so that (1) 2/3 could be used to feed the oysters of the 2 control or the 2 contaminated EUs and (2) 1/3 could be used to monitor the algae contamination of control or contaminated algae. Both samples were completed up to 600 mL with F/2 cell culture media.

One of the two initial samples was spiked with a PAH solution and the two microalgae samples were placed on an agitation table during 1 hour. After agitation, the two samples were subdivided into 3 subsamples of 200 mL. Two of them were connected to an aeration device to ensure homogeneity of the inoculum and separately injected over time (approximately 8h) into the 2 control or the 2 contaminated EUs with a peristaltic pump. The third 200 mL subsample was filtered on a previously calcined (4h at 450°C) and weighted glass microfiber filter (Whatman GF/F 0,7 μ m). Filtrate was conserved in previously calcined 10 mL glass vial and stored at -20°C with the filters before PAH analysis.

2.3/ Contamination management

The algae were spiked before agitation with a cocktail of 8 PAH dissolved in ethanol. The proportions of each compound in the cocktail was based on field measures previously performed on the bay suspended particulate matter (Crespo, 2009). The cocktail was prepared from individual PAH solutions of phenanthrene (Phe), fluoranthene (Fluo), pyrene (Pyr), chrysene (Chrys), benzo(a)anthracene (BaA), benzo(b)fluoranthène (BbF), benzo(a)pyrene (BaP) and indéno(1,2,3-c,d)pyrene (IP). These solutions were prepared by dissolution of pure crystals (purity > 98%) purchased from Sigma Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA) in ethanol.

As previously mentioned, algae were injected over time during approximately 8h per day. Daily PAH inputs via dissolved and particulate routes were therefore expressed in ng/oyster/day and presented in the table 1.

Table 1: mean PAH inputs via the particulate and the dissolved routes. The % column represents the relative proportion of each compound in the daily PAH input.

Compounds	Particulate phase			Dissolved phase	
	[PAH] _{measured} (ng/g, dw)	ng/oyster/day	%	ng/oyster/day	%
Phenanthrene	187 ± 129	0.16 ± 0.1	4	3.71 ± 1.12	33
Fluoranthene	414 ± 277	0.32 ± 0.18	8	3.35 ± 0.98	30
Pyrene	333 ± 224	0.38 ± 0.21	9	2.11 ± 0.66	19
Benzo(a)anthracene	424 ± 233	0.37 ± 0.16	9	0.48 ± 0.22	4
Chrysene	239 ± 123	0.28 ± 0.11	7	0.29 ± 0.14	3
Benzo(b)fluoranthene	969 ± 439	1.04 ± 0.28	23	0.46 ± 0.28	4
Benzo(a)pyrene	871 ± 385	0.76 ± 0.20	17	0.46 ± 0.28	4
Indeno(1,2,3_c,d)pyrene	1215 ± 535	1.11 ± 0.3	23	0.22 ± 0.17	2
Sum	4652 ± 2344	4.43 ± 1.54	100	11.07 ± 3.85	100

2.4/ PAH bioaccumulation

The concentration of the 8 studied PAH was assessed in freeze-dried pools of 10 gills or digestive glands for every sampling time. After milling and homogenization, samples were weighted (0.1 to 0.2 g) and spiked with a 1 µg/g isooctane solution of internal standards (Phe-d10, Fluo-d10, Chrys-d12, BeP-d12, BaP-d12 and Benzo[ghi]perylene-d12) according to the presumed contamination of the matrix. 15 mL of dichloromethane (DCM) were added prior to the extraction in a microwave extraction system (Start E, Milestone) at 80°C during 5 min. The resulting extracts were then concentrated to about 3 mL at 51°C during 20 min at a vortex motion of 70% in a vacuum dry evaporator (RapidVap, Labconco) after filtration on pre-cleaned glasswool. Purification of the extracts was then performed on glass micro columns (L=10 cm, i.d 0.5 mm) in order to eliminate macromolecules, pigments and unsaturated hydrocarbons. Firstly, samples were deposited on alumina micro columns previously conditioned with 5 mL of DCM. The elution of the purified extract was realized under vacuum with 3x5 mL of DCM. The eluates were then concentrated under argon at 45°C and 1 mL of isooctane was added prior to the total DCM evaporation in order to change the solvent.

Silica micro columns, conditioned with 5 mL of pentane, were finally used to perform the last purification. After sample deposition, unsaturated hydrocarbons were eliminated using 2 mL of pentane. The elution of the aromatic fraction was finally performed under vacuum using 3x5 mL of a DCM/pentane mix (35:65, v/v). A final concentration step under nitrogen at 45°C was necessary to transfer the purified extract into glass restrictors (150 µL). Surrogate internal standards (Pyr-d10 and BbF- d12) were added to the sample prior to chromatographic analysis to assess potential compounds loss.

PAH were quantified using gas chromatography coupled to mass spectrometry (model GC 6890 coupled to MS 5973 inert MSD, Agilent Technologies, Waghäusel, Germany). 1 µL of sample was injected via pulsed-splitless mode with Helium (purity 6.0) as a carrier gas (1.3 mL/min). Injector temperature was 280°C and compounds were separated with a HP-5MS-Ultra Inert 19091S-433 capillary column ((5%-Phenyl)-methylpolysiloxane; 30m length x 250 µm internal diameter x 0.25 µm

film thickness; Agilent Technologies, Massy, France). The oven temperature program was: 2 min at 50°C, 1 min at 250°C after increase at 10°C per min, 1 min at 280°C after increase at 2°C per min and 10 min at 310°C after increase at 10°C per min. After separation, analytes were detected in a mass selective detector (MSD). Ionization was performed by electron impact (70 eV), with a source temperature of 230°C and ion selection was performed with a quadripole heated at 150°C. Signals were obtained in SIM mode with a dwell time of 40 ms.

2.5/ Metallothioneins determination

The extraction was performed with 50 to 150 mg of gills or digestive gland according to the method described by Baudrimont et al. (1997). Tissues were grinded in 1 mL of 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2 at 20°C) on ice and under nitrogen atmosphere using a tissue homogenizer (T10 - IKA Ultra-Turrax). Centrifugation (1h; 20000 g) was performed at 4°C and samples were duplicated by sampling 2 x 200 µL of supernatant into 1.5 mL microtubes; 3 blanks and 3 reference samples were prepared additionally (3x200 µL of 25 mM Tris-HCl buffer and 3x200 µL of diluted rabbit liver metallothionein solution at 10 µg MT/mL purchased from Sigma Aldrich).

200 µL of an acid inorganic mercury solution were added (HgCl₂ at 10 mg/L and 10% of trichloroacetic acid) in order to precipitate high molecular weight proteins and to saturate metallothioneins. After homogenization and 10 min of incubation, 400 µL of a porcine hemoglobin solution (1g of porcine lyophilized hemoglobin purchased from Sigma-Aldrich + 40 mL of 30 mM Tris-HCl buffer) were added to every sample aiming to scavenge the excessive Hg(II). Centrifugation was then quickly performed during 20 min at 20000 g and supernatants were recovered.

Finally mercury burdens were quantified in 100 µL of every sample using atomic absorption spectrometry (LECO AMA 254, ALTEC, Prague, Czech Republic) so that MTs concentration of the whole organ could be indirectly deduced and expressed in nmol Hg binding sites/g, fw.

2.6/ Genetic analyses

Total RNAs were extracted from 30 - 50 mg of gills and digestive glands (n = 5 per condition and sampling time) using the Absolutely RNA Miniprep Kit (Agilent technologies) according to manufacturer's instructions. RNAs were stored at -80°C until retro-transcription into single stranded cDNA was performed. 14 µL (3 to 5 µg) of total RNAs were used to perform the reaction with the AffinityScript cDNA Synthesis Kit (Agilent technologies) according to manufacturer's instructions. The resulting cDNA were stored at -20°C until the RT-qPCR was performed. This step was realized using Brilliant III Ultrafast SYBR QPCR kits (Agilent technologies) according to manufacturer's instruction in a Stratagene Mx3000P thermocycler (Agilent technologies). The thermic profile was composed of 1 cycle of 10 min at 95°C and 40 amplification cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 55°C and 30 s at 72°C. Cycle thresholds (C_t) were obtained with MxPro – Mx3000P software (Stratagene 2007) and the relative gene expressions of 10 genes (Table 2) involved in stress responses were assessed by the 2^{-ΔC_t} method of Livak and Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001) after normalization according

to β -actin expression. Mean fold inductions (MFI) were calculated between each treatment and its respective control when significant differences of expressions were obtained following this equation:

$$\text{MFI} = 2^{(-\Delta\text{Ct treatment})} / 2^{(-\Delta\text{Ct control})}$$

Table 2: Accession numbers and specific primer pairs for the 10 genes from *C.Gigas* used in qPCR.

Gene function and name	Accession number	Forward primer	Reverse primer
Mitochondrial metabolism			
<i>cox1</i>	AB033687	GTGCCAACTGGTATTAAGGTGT	ACACCGCACCCATTGAT
Oxidative stress response			
<i>sod</i>	AJ496219	CCAGAGGATCACGAGAGGC	GCGTTTCCGGTCGTCTT
<i>cat</i>	EF687775.1	GTCGTGCCCTTTACAACC	CGCCCGTCCGAAGTTT
<i>sodmt</i>	EU420128	ACAAAGTCAATCAGTGCCCT	CCATTGCCTCTGCCAGT
<i>gpx</i>	EF692639	ATCGAACGCTGCACCA	AGCTCCGTCGCATTGT
Detoxification			
<i>mt1</i>	AJ242657	TGTCTGCTCTGATTCGTGTCC	GGTCCTTTGTTACACGCACTCATT
<i>mt2</i>	AJ297818	TCCGGATGTGGCTGCAAAGTCAAG	GGTCCTTTGTTACACGCACTCATT
<i>mxr</i>	AJ422120	AGGAAGGGCAGTTGAGTG	CGTTGGCCTCCTTAGCG
Metabolization			
<i>cyp1A1</i>	EF645271	AGGCATAGGGCTCCCAC	CTGGTTTCGCGGGTTTCAT
<i>gst</i>	AJ557140	AGGCTACCGAAATGGCTG	CTCTGACTTGTAATAGGCCGC
Reference			
<i>β-act</i>	AB071191	AGTACCCCATGAACACGG	TGGCGGGAGCGTTGAA

Abbreviations: *mt*: metallothionein; *cox1*: cytochrome C oxidase subunit I; *gpx*: glutathione peroxidase; *sod*: superoxide dismutase; *cat*: catalase; *sodmt*: mitochondrial superoxide dismutase; *mxr*: multixenobiotic resistance; *gst*: glutathione S transferase, *cyp*: cytochrome P450, *β -act*: actin.

2.7/ Comet assay

A 23-gauge needle and syringe were used to extract hemolymph from the adductor muscle, which was immediately transferred to a 1.5 mL microtube placed on ice. The cells were centrifuged at 200 g for 5 minutes at 4°C, after which the supernatant was discarded. The pellet was resuspended in 100 μ L of Kenny's Salt Solution (23.5 g NaCl, 0.7 g KCl, 0.1 g K₂HPO₄, 0.2 g NaHCO₃ in 1L of ultrapure water). The cell density was then 12.10⁵ cells/mL.

The alkaline comet assay for oyster hemocytes was processed according to the protocol produced by Morin et al. (2011) with minor modifications. 50 μ L of cell suspension was added to 100 μ L of 1% low melting point agarose (LMPA) and two gels of 50 μ L (about 20000 cells/gel) were laid down on a precoated slide and covered with a 18x18 mm glass coverslip. Electrophoresis was carried out at 25 V, 300 mA for 15 min. DNA damage was expressed as percentage tail DNA (Hartmann et al., 2003), and 150 randomly selected nucleoids were analysed on two replicated gels. Heavily damaged cells exhibiting a specific microscopic image (commonly referred to as hedge-hogs or ghost cells) consisting of small or non-existent head and large and diffuse tail (potentially represent dead or dying

cells) are considered to be apoptotic or necrotic cells as previously described (Olive and Banath, 1995). These cells were excluded from data collection.

2.8/ Statistical analysis

XLSTAT software (Addinsoft 2013) was used to perform all the statistical analyses. Parametric methods were used to analyse the metallothioneins and the genotoxicity data. Levene and Shapiro-Wilk tests were used to assess homoscedasticity and normality of data. Therefore, three ways analyses of variance (ANOVA) were performed to assess ploidy, treatment and time effects as well as their interaction effect upon the MTs concentrations. The post-hoc Highest Significant Difference test of Tuckey (Tuckey-HSD) was employed in case of significant result ($p < 0.05$). As the ANOVA performed on the genotoxicity data did not exhibit a significant percentage of variability, pairwise Student comparison (test t) were performed at each sampling time to detect potential treatment effect in diploid and triploid oysters. As normality could not be obtained for genetic data, non-parametric methods were employed. The Mann-Whitney comparison was therefore performed at each sampling time to identify potential treatment effect in diploid or triploid condition. In case of significance, a MFI was calculated as described above.

3/ Results

3.1/ PAH accumulation

The total concentrations of the 8 studied PAH in the gills and the digestive glands of the sampled oysters are presented in the figure 2 and the detail for each compound is presented per treatment in the table 3. Throughout the experiment, the highest levels were observed in the digestive gland. The three most present compounds in both of the studied organs were Fluo, Pyr, BbF, whereas Phe, BaA, BaP and IP were the less concentrated.

The control oysters were characterized in both of the studied organs by a PAH concentration decrease. This phenomenon is especially observable in the digestive gland of the diploid and triploid control oysters, with drops of 36 and 58 ng/g, dw (-21% and -25%). These observations can be principally attributed to strong diminutions of Fluo (-17%), Pyr (-30%), BaA (-32%), BbF (-25%) and BaP (-47%) for the diploids or Phe (-26%), Fluo (-30%), Pyr (-33%) and BbF (-19%) for the triploids. Percentages of BaP and IP loss were high as well, but represented low quantities as these compounds were the less concentrated.

The exposed diploid oysters were characterized by a relative stability of the total PAH concentration in both of the organs. During the 21 days of exposure, the compounds Fluo, Pyr, Chrys and BbF began to decrease (gills: -15%; -16%; -15%; -9% and digestive gland: -11%; -19%; -3%; -4%) The loss of these PAH was compensated by notable gains of all the other compounds: mainly Phe in the gills (+43%) and of the heaviest compounds: BaP and IP in both of the studied organs (gills: +23%; +391% and digestive gland: +53%; +208%). Finally, triploid exposed oysters showed the strongest contamination increase in both of the organs, with a total gain of 42 ng/g, dw in the gills (+40%) and 30 ng/g, dw in

the digestive gland (+13%). These augmentations are mainly attributed in the gills to Phe (+158%), BaA (+93%), BbF (+38%) and IP (+468%) and in the digestive gland to Phe (+39%), BbF (+20%), and IP (+236%).

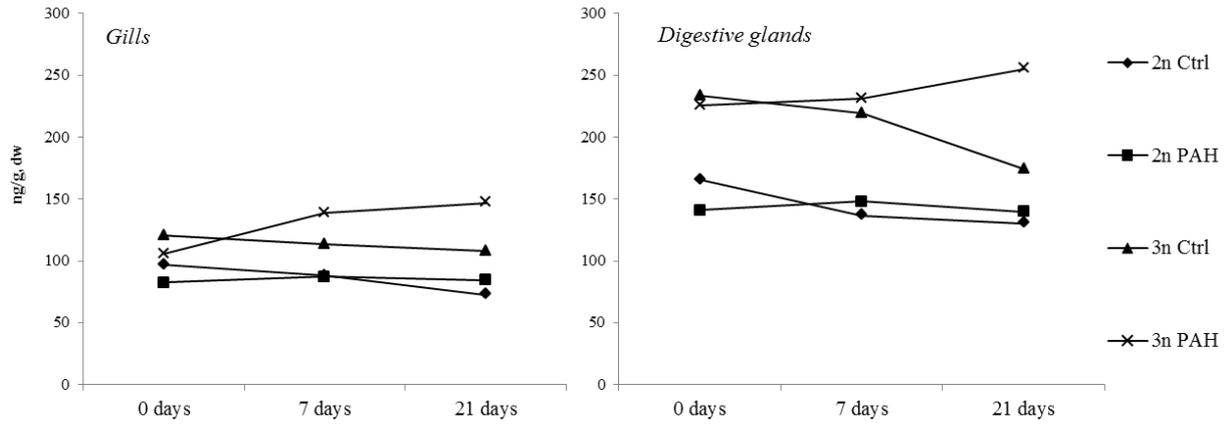


Figure 2: Total concentrations of the 8 studied PAH in the gills (left) and the digestive glands (right) of the sampled oysters.

Table 3: Concentrations of the 8 studied PAH over time in the sampled oysters (ng/g, dw). The (%) column indicates the variations of concentrations (gain or loss) after 21 days of experimentation for every treatment.

Compounds	Diploid								Triploid								
	Control				Exposed				Control				Exposed				
	0 d.	7 d.	21 d.	%	0 d.	7 d.	21 d.	%	0 d.	7 d.	21 d.	%	0 d.	7 d.	21 d.	%	
Gills (ng/g, dw)	Phe	6	7	9	+51	6	8	8	+43	9	8	8	-7	6	10	17	+158
	Fluo	18	16	15	-13	16	16	14	-15	23	22	22	-5	22	26	23	+4
	Pyr	20	19	15	-27	17	17	15	-16	26	24	22	-14	23	26	24	+2
	BaA	6	4	4	-34	5	5	6	+22	6	6	6	-8	6	9	11	+93
	Chrys	11	9	10	-5	10	8	9	-15	12	11	13	+8	12	13	16	+39
	BbF	26	24	17	-34	23	22	21	-9	34	36	32	-7	31	39	42	+38
	BaP	9	6	1	-83	3	4	4	+23	8	5	3	-59	4	7	4	+14
	IP	2	2	1	-53	2	8	8	+391	3	3	2	-25	2	9	10	+468
	Sum	97	88	73	-25	83	87	85	+2	120	113	108	-10	105	139	147	+40
Digestive gland (ng/g, dw)	Phe	13	13	15	+15	15	14	15	+1	19	15	14	-26	16	16	22	+39
	Fluo	36	30	30	-17	30	33	27	-11	54	47	38	-30	52	50	52	-1
	Pyr	44	36	31	-30	35	37	29	-19	60	52	40	-33	58	53	54	-7
	BaA	7	5	5	-32	6	6	7	+14	9	10	7	-16	10	12	12	+24
	Chrys	17	14	17	-4	14	15	14	-3	22	21	19	-14	22	24	25	+15
	BbF	38	34	29	-25	33	31	32	-4	59	62	48	-19	55	59	67	+20
	BaP	7	3	4	-47	5	6	8	+53	6	8	5	-11	8	7	10	+29
	IP	3	3	1	-62	3	6	9	+208	4	5	3	-31	4	9	13	+236
	Sum	166	137	130	-21	141	148	140	-1	233	219	174	-25	225	231	255	+13

3.2/ Metallothioneins analyses

The figures 4 and 5 present the MTs concentrations in the gills and the digestive glands of the studied oysters. The ANOVA did not detect any effect of time, treatment or ploidy upon the MTs concentrations in the gills. The values in this organ are ranged from 7.8 ± 3.3 nmol Hg/g, fw in the 2n Ctrl after 21 days, to 15.7 ± 3.8 nmol Hg/g, fw in the 3n exposed oysters.

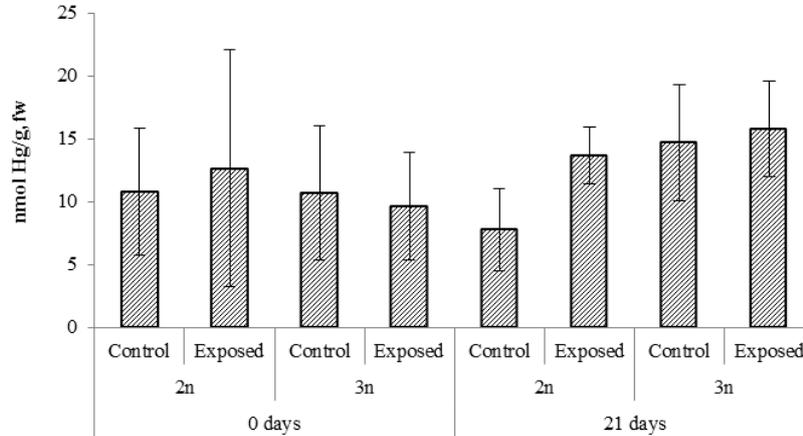


Figure 4: Mean metallothionein concentrations measured in the gills of the sampled oysters (n=5; mean \pm SD). Letters indicate significant differences according to the three way ANOVA (p<0.05).

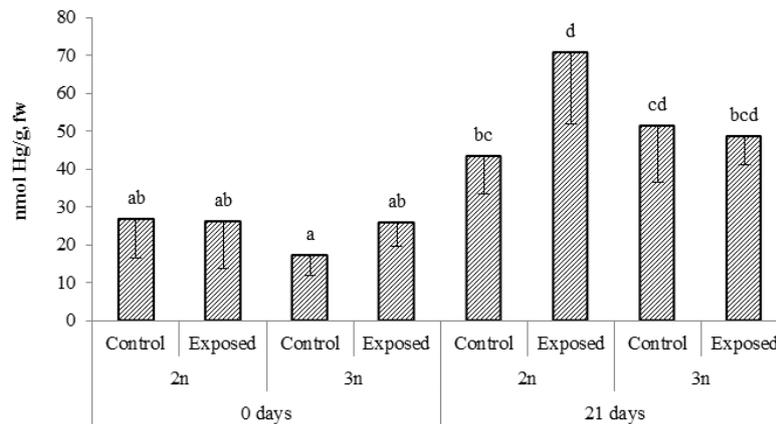


Figure 5: Mean metallothionein concentrations measured in the digestive glands of the sampled oysters (n=5; mean \pm SD). Letters indicate significant differences according to the three way ANOVA (p<0.05).

On the other hand, the digestive gland exhibited a significant interaction effect between ploidy, treatment and time. The 2n exposed oysters and the 3n control oysters showed a time effect with significantly increased concentrations after 21 days of experimentation (2n PAH: from 26.3 ± 12.3 to 70.7 ± 18.7 nmol Hg/g, fw; 3n Ctrl : from 17.3 ± 5.4 to 51.5 ± 14.9 nmol Hg/g, fw). The highest level was reached in the digestive gland after 21 days in the 2n PAH oysters (70.7 ± 18.7 nmol Hg/g, fw). No differences were detected between any of the experimental treatments or biological model at day 0. The only significant treatment effect observed appears after 21 days of exposure in the digestive gland of the diploid oysters: control (43.4 ± 9.8 nmol Hg/g, fw) < exposed (70.7 ± 18.7 nmol Hg/g, fw). No differences between diploid or triploid oysters are exhibited by the MTs concentrations after 21 days of experimentation.

3.3/ Relative gene expressions and genotoxicity

Tables 4 and 5 present the calculated MFI for the diploid and the triploid oysters. The gene response is very low in the diploid oysters. The studied organisms did not exhibit any significant response after 7 days of exposure. The PAH exposure seemed to affect 2 genes after 21 days: *sod* in the gills (8 fold up-regulation) and *mt1* in the digestive gland (down-regulation).

Triploid oysters were more impacted by the contamination. Although no significant effect was detected in the gills, a marked response was observed in the digestive gland. A *coxI* down-regulation (0.4) was highlighted after 7 days. At the end of the kinetic, three genes involved in the oxidative stress response were down-regulated (*gpx*: 0.3; *cat*: 0.3; *sodmt*: 0.5) and one gene implied in the xenobiotics metabolism was repressed (*gst*: 0.4).

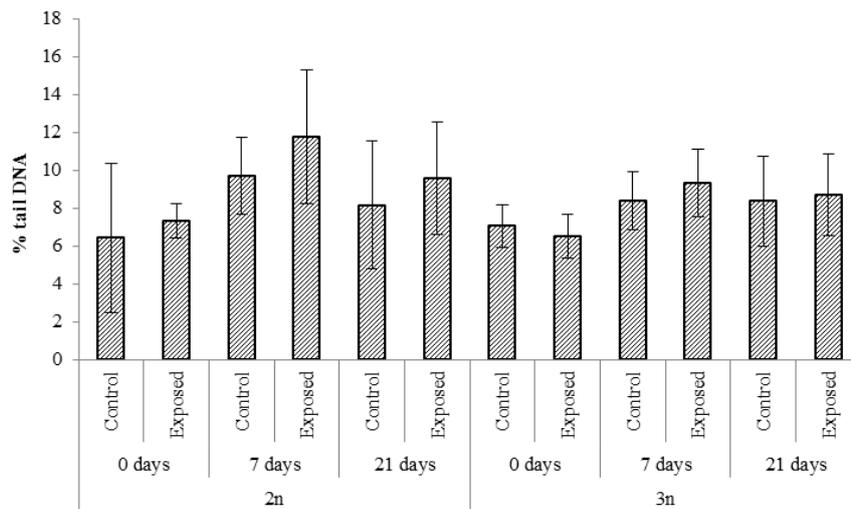
The figure 3 presents the % tail DNA measured after comet assay was performed on the oysters' hemocytes. As three ways ANOVA could not be performed, pairwise comparisons were made (Student t test) between every exposed treatment and its corresponding control. No contamination effect was detected. Ploidy effect was assessed as well, and no differences were exhibited between the two models.

Table 4: MFI of the 10 studied genes in the gills and the digestive gland of the diploid oysters.

Function and gene	Gills		Digestive gland	
	7 days	21 days	7 days	21 days
Oxidative stress response				
<i>gpx</i>	/	/	/	/
<i>sod</i>	/	8,2	/	/
<i>cat</i>	/	/	/	/
<i>sodmt</i>	/	/	/	/
Metabolization				
<i>cyp1a1</i>	/	/	/	/
<i>gst</i>	/	/	/	/
Detoxification				
<i>mxr</i>	/	/	/	/
<i>mt1</i>	/	/	/	0,5
<i>mt2</i>	/	/	/	/
Mitochondrial metabolism				
<i>coxI</i>	/	/	/	/

Table 5: MFI of the 10 studied genes in the gills and the digestive gland of the triploid oysters.

Function and gene	Gills		Digestive gland	
	7 days	21 days	7 days	21 days
Oxidative stress response				
<i>gpx</i>	/	/	/	0,3
<i>sod</i>	/	/	/	/
<i>cat</i>	/	/	/	0,3
<i>sodmt</i>	/	/	/	0,5
Metabolization				
<i>cyp1a1</i>	/	/	/	/
<i>gst</i>	/	/	/	0,4
Detoxification				
<i>mxr</i>	/	/	/	/
<i>mt1</i>	/	/	/	/
<i>mt2</i>	/	/	/	/
Mitochondrial metabolism				
<i>coxI</i>	/	/	0,4	/

Figure 3: Percentage of tail DNA measured in the hemocytes of the studied oysters (n=5; mean \pm SD).

4/ Discussion

4.1/ PAH contamination

This study represented an opportunity to investigate the biological response of *Crassostrea gigas* under environmentally relevant conditions of contamination. The results obtained after PAH quantitation were satisfying, as they were close to field measures (200 – 2000 ng/g, dw; Abou Mrad, 2011; Crespo, 2009). The daily inputs per oyster presented in the table 1 indicate a contamination via the dissolved and the trophic route. The dissolved phase is clearly dominated by the low molecular

weight contaminants Phe, Fluo and Pyr to a lesser extent. On the opposite, the particulate input is characterized by a dominance of the heaviest compounds BbF, BaP and IP. These observations are consistent with previous observations (Martins et al., 2013) and the chemical properties of such molecules: their aqueous solubility decreases with the number of cycles they present (Kim et al., 2013).

The observed PAH accumulation in the oysters was quite low as expected. An inter-organ difference is however observed during the entire kinetic. From day 0 to day 21, the gills systematically presented inferior PAH levels in comparison with the digestive glands. This observation is particularly marked for the triploid oysters. Several hypotheses can explain this phenomenon. Firstly, PAH are known to be mainly hydrophobic compounds (Kim et al., 2013) and present a subsequent capacity to adsorb on suspended particulate matter as it was observed in many studies (Guo et al., 2007; Luo et al., 2006; Patrolecco et al., 2010). As oysters are filter feeding organisms, we can reasonably assume that the basal contamination measured at day 0 is the consequence of a higher trophic contamination. Furthermore, the digestive glands of oysters were described as one of the principal lipid storage organ during the winter resting period (Berthelin et al., 2000). The lipophilicity of our compounds is therefore in accordance with the superior contamination of the digestive gland.

The PAH contamination of the triploid oysters was superior at the beginning of the experimentation, which could be attributed to a higher exposition during their growing phase in the bay. Although the organisms were originated from the same location, previous field work (unpublished data) demonstrated strong sediment heterogeneity concerning the PAH contamination in the bay. This could partially explain the contamination differences between the diploid and the triploid oysters, as sediments were proved to represent a significant source of PAH for filter feeding organisms (Baumard et al., 1998b).

The kinetic of the PAH accumulation over time showed that all the control oysters were characterized by a slight drop of the total concentrations, as evidenced by the table 3. Statistical analyses by Kruskal-Wallis test (data not shown) highlighted a stability of the organs' weights during the entire exposure. The observed diminutions of PAH concentration can therefore not be associated to mass variations, but potentially to a metabolization of the organic compounds. PAH are indeed subjected to metabolization in aquatic organisms (Chaty et al., 2004; Lazartigues et al., 2011; Trisciani et al., 2011; Wessel et al., 2010; Zanette et al., 2013). Although these biological processes are reputed to be less effective in bivalves in comparison to fish, our results confirm the depuration ability of *Crassostrea gigas* facing a PAH contamination.

The observed depuration depended on the compound, the ploidy and the organ. The comparison of the initial and the final contamination status of control oysters highlighted stronger loss in the gills of the diploids, and a slightly stronger loss in the digestive gland of the triploids. The same compounds seemed to be concerned by the depuration process in the gills and the digestive gland of the diploid oysters (BaP, BbF, IP, Pyr, BaA). Metabolization of Pyr has already been demonstrated in oysters (Bustamante et al., 2012), and BaA depuration has already been characterized with mussels (Akcha et

al., 2000a; Yakan et al., 2011). Triploid oysters on the other hand exhibited certain heterogeneity between the gills (IP, BaP, Pyr) and the digestive gland (Phe, Fluo, Pyr). The INERIS technical reviews of the studied compounds do not report any significant differences concerning the behavior of the studied molecules towards bioaccumulation in aquatic organisms. We can however hypothesize a role of the contaminant burden. Fluo, Pyr and BbF are indeed the three most concentrated compounds in the organisms (data not shown). Their superior presence may potentially be associated to a higher activity of the metabolizing enzymes towards them, explaining the stronger depuration observed here. BaP and IP were also strongly depurated, which is in accordance with previous work on the American oyster (*Crassostrea virginica*) highlighting similar half-lives between these compounds and Pyr (Sericano et al., 1996).

The exposed oysters on the opposite showed a stabilization of the contamination for the diploids, and a bioaccumulation process for the triploids. However, the apparent stability of the PAH concentrations in the diploid oysters is not representative of the real accumulation. Considering separately each compound, it appears that losses of Fluo, Pyr, Chrys and BbF are compensated by gains of BaA, BaP, IP and Phe for the gills. As mentioned before, Fluo, Pyr and BbF are the most concentrated compounds in the studied organisms. Their concentration is therefore very likely to be regulated in the contaminated oysters, as well as in the controls. Their inferior accumulation may be the result of a competition between depuration and accumulation processes. Surprisingly, the low molecular weight compound Phe exhibits a different pattern. In spite of its similarities with Fluo and Pyr in terms of molecular weight, this molecule shows high accumulation efficiency in the gills of both diploids and triploids exposed oysters. Although a transfer from the digestive gland cannot be excluded, this observation indicates a preferential dissolved pathway of contamination for this compound in accordance with its chemical properties. The high efficiency of absorption observed for Phe may be associated to its low basal concentration in the oysters' tissues. Accordingly to our previous statement, this molecule is very likely to be less depurated in comparison to Fluo and Pyr. The heaviest molecule IP presents the highest rates of absorption, in accordance with its high hydrophobicity and its maximum adsorption on the algae (Narbonne et al., 1999).

Globally, a higher efficiency of PAH accumulation were evidenced in the triploid oysters. The differential behavior of diploid and triploid oysters towards PAH contamination may be partially explained by: (1) a potential difference in their respective lipid contents, although it has never been specially highlighted before during the resting period (Béatrice Gagnaire et al., 2006; Gouletquer et al., 1996; Haure et al., 2003); (2) differences in feeding behavior (Hawkins et al., 2000). Previous work on phycotoxins and *C. gigas* highlighted a superior uptake of toxins by triploid oysters, but was attributed to their late sexual maturation (Guéguen et al., 2012; Haberkorn et al., 2010). On the other hand, Marie and coworkers (Marie et al., 2006b) could not evidence differences concerning Cd and Zn uptake between diploid and triploid oysters.

4.2/ Biological response

The biological response facing the applied contamination was globally quite low. The concentration applied seemed to be insufficient to induce any additional DNA breaks in comparison to control oysters, indicating an absence of genotoxic effect. PAH are yet known to induce this kind of damage as previously evidenced in several works on fish and bivalves (Michel et al., 2013; Wessel et al., 2010).

Differential responses were observed on the other hand between diploid and triploid oysters. Only the diploid exhibited an increased MTs production in comparison to control after 21 days of exposure in the digestive gland. This observation may be associated to a potential enhanced oxidative stress in this organ, as these proteins are involved in reactive oxygen species (ROS) scavenging (Amiard et al., 2006; Anderson et al., 1999; Ruttkay-Nedecky et al., 2013). Boutet and coworkers have already described at the gene level an induction of chaperone proteins facing a PAH contamination (Boutet et al., 2004b). However, Marie and coworkers did not evidence any ploidy effect upon MTs production facing a metal contamination (Marie et al., 2006a). As previously mentioned, although the total PAH burden of the diploid did not seem to change over time, the concentration of some compounds decreased, indicating a potential metabolization process. These lipophilic organic compounds are known to be degraded into more soluble forms by phase I metabolization enzymes such as CYP1A (Rewitz et al., 2006; Zanette et al., 2010) in order to be excreted. This metabolic activation induces the production of highly toxic products, and can be accompanied by ROS production (Martins et al., 2013; Xue and Warshawsky, 2005), which is in accordance with our observations. Surprisingly, the triploid oysters did not exhibit a higher MTs production in the digestive gland facing the PAH contamination.

Concerning the relative gene expressions, diploid oysters exhibited the less marked response. The overexpression of *sod* in the gills is in accordance with the work of Boutet and coworkers (Boutet et al., 2004b) and corroborates the previous hypothesis of oxidative stress as this enzyme is involved in the conversion of superoxide anion into hydrogen peroxide (Béguel et al., 2013). The down-regulation of the *mt1* gene in the digestive gland is inconsistent with the higher protein production previously mentioned. However, it may potentially be attributed to a negative retro-control facing the increased level of the protein. We can therefore conclude regarding the gene expressions, that diploid oysters exhibit a consistent adaptive response facing the applied contamination, in accordance with the environmental concentrations adopted here.

On the other hand, triploid oysters showed a marked gene response in the digestive gland, mainly after 21 days of exposure. This observation is in accordance with the observed trophic contamination and the assumed role of this organ in depuration process. As previously mentioned the triploid oysters showed a higher contamination level and were supposed to actively metabolize certain compounds. We can reasonably assume that such conditions are favorable to ROS and active metabolites production. As no genotoxic effect were detected by the comet assay it is therefore very likely that the produced metabolites and the ROS did not interact to a high extent with DNA. However, regarding the measured down-regulation of the antioxidant system several hypothesis can be formed: (1) ROS and

active metabolites are known to interact with nucleic acids (Goetz and Luch, 2008; Xue and Warshawsky, 2005) as RNA; such interaction may potentially affect the integrity of the molecule and lead to degradation; (2) although obviously limited, we can assume that their interaction with DNA was sufficient to decrease the mRNA production, but not to threaten the DNA integrity. Epigenetic effects cannot be excluded as BaP were reported to induce DNA methylation variations in Zebra fish exposed to environmentally relevant concentrations without genotoxic effect (Vandegheuchte and Janssen, 2013). Furthermore, the impairment of *coxI* and *sodmt* expression is consistent with an affliction of the mitochondrial activity. This is in accordance with the work of Jeong and Cho, showing that a prolonged exposure to PAH (4 weeks) via the dissolved route (50 µg/L) may impair the energy management of the oysters (Jeong and Cho, 2007).

Our study therefore indicates a higher sensitivity of triploid oysters in relation to potentially higher metabolic rates (Hawkins et al., 2000). Previous studies highlighted differential energy allocation strategies according to sexual maturation status (Béatrice Gagnaire et al., 2006; Guéguen et al., 2012), but there is no consensus concerning the resting period. Clearance rates and PAH active metabolites measurements could have been relevant parameters to study in order to justify the higher PAH accumulation and the stronger genic response observed with the triploid oysters. Still, our results are consistent with a higher absorption and a potential higher metabolization of PAH for the triploid. It seems that higher metabolic rates would be associated to higher active metabolites production and a more strong and early effect. On the other side, diploid oysters showed limited PAH absorption because of a competition between accumulation and metabolization. Their biological response was less strong, and corresponded to an adaptation facing a limited oxidative stress. A role of the animal history cannot be excluded, as the diploid oysters were naturally produced in the bay and could therefore exhibit inherited tolerance to the local contamination (Vandegheuchte and Janssen, 2013). Further studies remain needed to conclude upon the differential sensitivity of triploids facing an organic contamination by PAH.

5/ Acknowledgements

The ANR, RIPOST, the regional project OSQUAR, the SIBA are thanked for their financial support, so as the FEDER (This project is co-financed by the European Union with the European fund of regional development). The CPER A2E and the Region Aquitaine are thanked too for their support in financing the analytical equipment.

4. Voie préférentielle de contamination de *Crassostrea gigas* par le tributylétain et effets associés

4.1. Introduction

Le TBT est un contaminant emblématique dans l'histoire du bassin d'Arcachon. Sa présence dans les années 70 dans les eaux de la lagune fut à l'origine d'une crise majeure pour la profession ostréicole (Alzieu, 2000a). Actuellement interdit d'utilisation, ce polluant est cependant toujours surveillé du fait de son extrême toxicité pour les organismes aquatiques avec des effets visibles dès 0,1 ng/L (cf. Synthèse bibliographique : 3.3).

Les études menées actuellement ne concernent pas les concentrations en TBT mais plutôt ses effets délétères. L'imposex est ainsi devenu un biomarqueur de cette contamination et des suivis annuels dans le cadre de la convention OSPAR au niveau du littoral permettent de juger de la contamination résiduelle en TBT sur les côtes. Les dernières études menées indiquent qu'en dépit d'une diminution drastique des niveaux de contamination depuis les années 70, certaines valeurs de VDSI (*Vas Deferens* Sequence Index) mesurées chez *Ocenebra erinacea*⁵ demeurent cohérentes avec des concentrations de l'ordre du ng/L dans le bassin d'Arcachon (Toxem, 2012).

Dans ce contexte, nos travaux se sont donc intéressés à la toxicité de ce contaminant pour l'huître à des niveaux environnementaux cohérents avec les effets actuellement observés dans la lagune. Dans une perspective d'amélioration de nos connaissances concernant les voies d'entrée du TBT chez *C. gigas*, une expérience en laboratoire a été réalisée et deux voies de contamination ont été étudiées : la voie dissoute (TBT dissout dans l'eau de mer) et la voie trophique (TBT adsorbé sur une micro-algue *Isochrysis galbana*).

Ces travaux résultent d'une collaboration avec les laboratoires de l'Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux (IPREM) à Pau qui ont assuré l'acquisition des résultats de chimie (dosage du TBT, DBT, MBT dans l'eau, les branchies et les glandes digestives, fixation des butylétains sur les biomolécules, répartition cytosol/membranes des contaminants).

4.2. Matériels et méthodes

4.2.1. Conditions expérimentales et modèle biologique

Des huîtres diploïdes de 18 mois originaires du Grand Banc ont été obtenues auprès d'un ostréiculteur du bassin d'Arcachon. Les organismes ont été placés dans des bacs en verre équipés de poches en Perfluoroalkoxy (PFA) permettant d'éviter l'adsorption du contaminant sur les parois des unités expérimentales (UEs). Au total, 5 UEs ont été préparées :

- (1) un contrôle abiotique (CA) constitué uniquement d'eau contaminée

⁵ Ce gastéropode est utilisé dans le cadre du suivi des effets du TBT par la convention OSPAR. Les autres stations étudiées emploient *Nucella lapillus*.

- (2) un contrôle non contaminé (CNC) constitué d'eau et d'huîtres
- (3) une UE contaminée par voie dissoute (BD pour Bioaccumulation Dissoute) constitué d'eau contaminée et d'huîtres
- (4) un contrôle non contaminé trophique (CNCT) constitué d'eau enrichie en phytoplancton et d'huîtres
- (5) une UE contaminée par voie trophique (BT pour Bioaccumulation trophique) constituée d'eau enrichie en phytoplancton contaminé et d'huîtres.

En début d'expérimentation, chaque UE contenait 50 L d'eau de mer du bassin d'Arcachon non filtrée et 63 organismes (sauf CA) soit environ 790 mL d'eau par huître. La contamination des UEs a démarré après une acclimatation de deux jours à 15°C avec une alternance lumière/obscurité de 12h/12h.

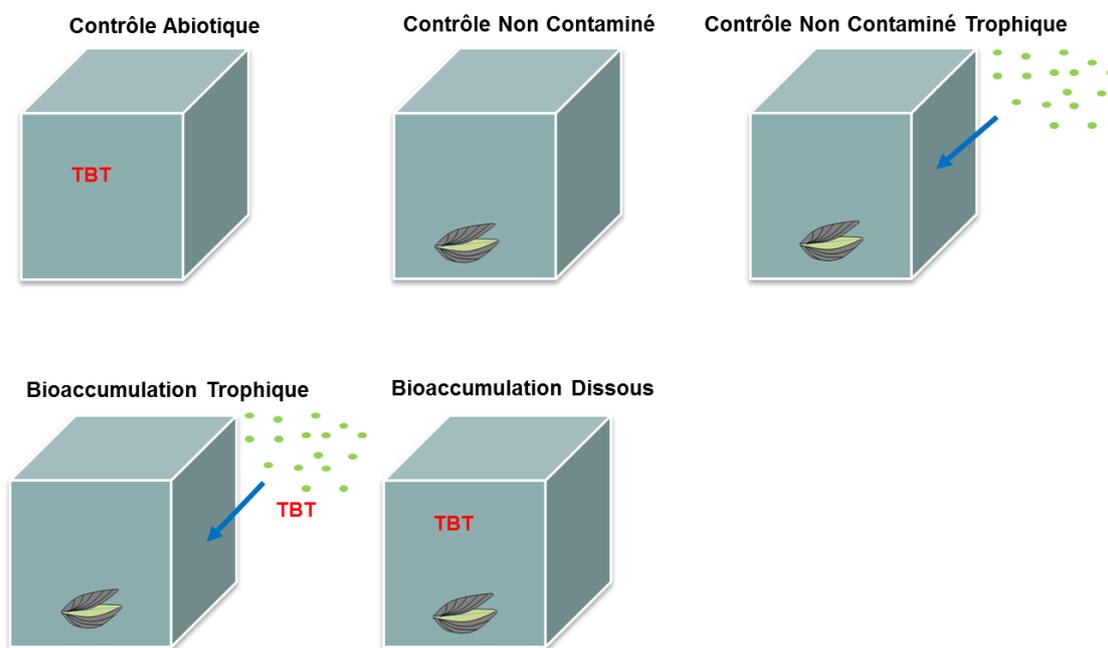


Figure 92 : Schéma du protocole expérimental mis en place pour l'étude des voies de contamination de *C. gigas* par le TBT

4.2.2. Stratégie d'échantillonnage et gestion de la contamination

Cinq huîtres ont été prélevées après 3 jours et 7 jours d'exposition dans les UEs CNC, CNCT, BD et BT pour le suivi des concentrations en métallothionéines (branchies et glandes digestives) et des expressions géniques relatives des 10 gènes de stress utilisés lors de notre approche *in situ* (branchies et glandes digestives).

Des prélèvements d'huîtres ont également été réalisés après 1, 3 et 7 jours pour la quantification du TBT et de ses produits de dégradation (DBT et MBT). Pour chaque huître prélevée, 790 mL d'eau ont été éliminés afin de maintenir des conditions stables de contamination pour les organismes.

Seules les huîtres des conditions CNCT et BT ont été nourries quotidiennement à raison de $35 \cdot 10^3$ cellules *Isochrysis galbana*/huître/litre d'eau (comptage sur cellule de Nageotte) en se basant sur les expériences de Strady et collaborateurs (2011).

Les niveaux de contamination en ^{117}TBT dans les UEs étaient de 10 ng/L en condition dissoute comme trophique. La contamination des algues a été réalisée par dopage de l'inoculum quotidien et agitation pendant 2h (table d'agitation ; erlenmeyer en verre). Le suivi en temps réel des concentrations n'ayant pas été possible, des ajouts compensatoires ont été réalisés tous les deux jours en se basant sur les cinétiques de dégradation observées lors de travaux préliminaires en novembre 2010. Les ajouts ont été réalisés « pour atteindre » des concentrations de 3 ng/L dans les UEs. En dépit de ces précautions, les niveaux de TBT dans l'eau n'ont pas pu être maintenus à 10 ng/L mais se sont stabilisés autour de 2 ng/L, ce qui est cohérent avec le niveau de contamination du bassin d'Arcachon.

4.2.3. Analyse des métallothionéines

La concentration en métallothionéines (MTs) a été déterminée par la méthode de saturation au mercure inorganique (Baudrimont et al., 1997) suivie d'un dosage du mercure par spectrométrie d'absorption atomique (LECO AMA 254, ALTEC, Prague, République Tchèque). Cette méthode se base sur l'affinité maximale du mercure pour les groupements « thiols » des MTs. La quantification du mercure après la saturation des protéines permet de mesurer indirectement le niveau de MTs, exprimé en nmol de sites de fixation du mercure par gramme de poids frais (pf). Ce protocole est décrit plus précisément dans la partie méthodologie (Eléments méthodologiques : 2.2).

4.2.4. Analyses génétiques

La technique employée est décrite dans la partie méthodologie (Eléments méthodologiques : 2.3.3). Les ARNs totaux ont été extraits de 30 – 50 mg de branchies et de glandes digestives (n = 5 par condition et par temps de prélèvement) en utilisant le kit « Absolutely RNA Miniprep Kit » (Agilent technologies) et en suivant les instructions du fabricant. Les ARNs ont été stockés à -80°C jusqu'à leur rétro-transcription en ADNc simple brin. Un volume de 14 μL d'ARNs totaux (3 à 5 μg) a été utilisé pour cette réaction en employant le kit « AffinityScript cDNA Synthesis Kit » (Agilent technologies) et en suivant les recommandations du fabricant. Les ADNc obtenus ont été conservés à -20°C jusqu'à la réalisation de la PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR). Cette étape a été réalisée grâce au kit « Brilliant III Ultrafast SYBR QPCR kits » (Agilent technologies) en suivant les recommandations du fabricant dans un thermocycleur « Stratagene Mx3000P (Agilent technologies).

Le profil thermique était composé d'un cycle de 10 minutes à 95°C et de 40 cycles d'amplification (30 secondes à 95°C puis 30 secondes à 55°C et 30 secondes à 72°C).

Les « Cycle treshold » (C_t) ont été obtenus grâce au logiciel MxPro – Mx3000P (Stratagene 2007) et l'expression génique relative de 10 gènes impliqués dans la réponse au stress (Synthèse bibliographique : 4.2.2 ; Tableau 3) a été évaluée par la méthode du $2^{-\Delta C_t}$ de Livak and Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001) après normalisation par rapport à l'expression de la β actine.

Des facteurs d'induction moyen (FIM) ont été calculés entre chaque traitement et son contrôle respectif lorsque des différences significatives d'expression ont été détectées. L'équation employée pour le calcul des FIM est la suivante :

$$\text{FIM} = 2^{-(\Delta C_t \text{ traitement})} / 2^{-(\Delta C_t \text{ contrôle})}$$

4.2.5. Analyses statistiques

Le logiciel XLSTAT (Addinsoft 2013) a été employé pour tous les tests statistiques. L'homoscédasticité et la normalité des données de métallothionéines ont été évaluées par les tests de Levene et de Shapiro-Wilk. Des analyses de variances à deux facteurs (ANOVA) ont donc été réalisées pour tester l'effet du temps, de la condition expérimentale et de leur interaction. Lorsqu'un effet significatif était détecté ($p < 0,05$), un test *a posteriori* de la plus grande différence significative de Tuckey était réalisé (post-hoc Tuckey HSD). Les données de génétique ont été analysées par le test non paramétrique de Mann-Whitney pour évaluer l'effet du traitement expérimental à chaque temps d'échantillonnage. Les conditions de contamination dissoute et trophique ont été systématiquement séparées pour toutes les analyses.

4.3. Résultats

4.3.1. Quantification des métallothionéines

Une ANOVA à deux facteurs a été réalisée pour détecter un rôle potentiel de la condition d'exposition et/ou du temps sur la concentration en MTs après contamination par voie dissoute et trophique. Aucun effet significatif n'a été détecté dans la glande digestive ou dans les restes du corps mou, seuls les résultats concernant les branchies seront donc montrés (Tableau 16, Figure 93).

Tableau 16 : Résultats de l'ANOVA à deux facteurs réalisée pour la comparaison des effets du temps et du traitement sur les concentrations en MT des huîtres exposées au TBT.

Traitement	R ²	Factor	df	Carrés moyens	F	p
Voie dissoute	0,44	Condition ^a	1	629,29	7,65	0,014*
		Temps	1	333,96	4,06	0,061
		Interaction ^c	1	60,07	0,73	0,405
		Erreur	16	82,24		
Voie trophique	0,59	Condition ^b	1	500,02	18,35	<0,001***
		Temps	1	11,65	0,43	0,523
		Interaction ^c	1	120,56	4,43	0,052
		Erreur	16	27,24		

^a contrôle dissous et contamination dissoute.

^b contrôle trophique et contamination trophique.

^c interaction des facteurs temps et condition.

* $p < 0,05$.

*** $p < 0,001$.

R² = coefficient de détermination; df = degrés de liberté; F = statistique de Fisher; p = p-valeur.

De plus, l'absence d'effet significatif du temps ou de son interaction avec la condition d'exposition permet de moyenniser les concentrations pour chaque traitement expérimental (Figure 93). En effet, ce facteur est le seul présentant un effet significatif sur le niveau de MTs par la voie dissoute ($p = 0,014$) et par la voie trophique ($p < 0,001$). Cependant, ces résultats doivent être interprétés en considérant le fait que les facteurs choisis et leur interaction n'expliquent que 44% et 59% de la variabilité expliquée

comme le montrent les valeurs de R^2 (Tableau 16). Les données complètes pour ce paramètre sont présentées en annexes (Annexes : 0).

La voie trophique présente un niveau moyen de MTs de 9,93 nmol Hg/g, pf pour le groupe contrôle et de 19,93 nmol Hg/g, pf pour le groupe contaminé (Figure 93). La voie dissoute présente un profil opposé avec une concentration maximale observée pour le groupe contrôle (22,29 nmol Hg/g, pf) et minimale pour le groupe contaminé (11,07 nmol Hg/g, pf).

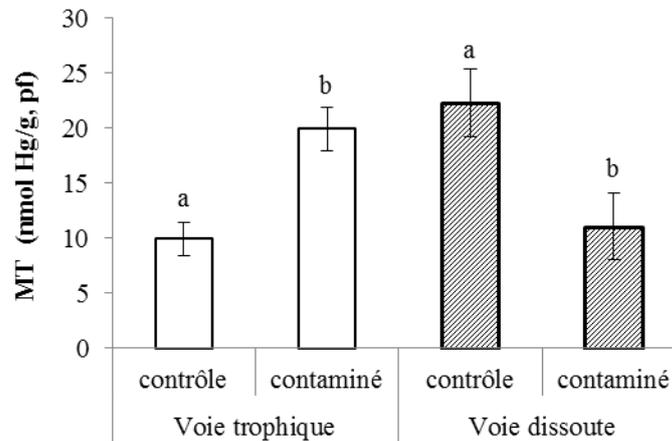


Figure 93 : Concentrations moyennes en métallothionéines dans les branchies et la glande digestive (moyenne \pm erreur standard) des huîtres contaminées par voie dissoute et trophique avec du TBT

4.3.2. Les expressions géniques relatives

Le modèle d'expression diffère fortement avec la voie de contamination et l'organe étudié. La voie dissoute ne semble pas induire de réponse significative dans les branchies ou la glande digestive des organismes étudiés. La seule fonction touchée est le métabolisme mitochondrial après 3 jours d'exposition, avec un facteur d'induction moyen de *cox1* de 3,8 (Tableau 17).

Les huîtres contaminées par la voie trophique en revanche répondent beaucoup plus fortement au TBT, particulièrement au niveau des branchies. De plus, cet organe présente une évolution du profil d'expression génique dans le temps, puisque des fonctions métaboliques différentes sont touchées entre 3 et 7 jours d'exposition.

Après 3 jours, la réponse au stress oxydant, la métabolisation des xénobiotiques et le système de détoxification sont partiellement inhibés par la contamination comme l'indiquent les facteurs d'induction moyens des gènes *sodmt*, *cat*, *mxr* et *gst* (< 1 , Tableau 17). Les deux isoformes des métallothionéines (*mt1* et *mt2*) et la sous-unité 1 de la cytochrome-c-oxydase *cox1* montrent pourtant des surexpressions au même moment avec des facteurs d'induction moyens de 2,9, de 2,6 et de 2,1 respectivement.

Après 7 jours de contamination dans le même organe, les réponses transcriptomiques sont modifiées de façon importante, avec de fortes inductions de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant (*sod* : 5,1 ; *sodmt* : 6,4 ; *cat* : 3,9) et dans la métabolisation des xénobiotiques (*cypl1* : 7,8).

Enfin, bien que cohérents avec les inductions de *mt2* et *mxr* dans les branchies, les niveaux d'expression dans la glande digestive n'ont pas semblé affectés par la contamination à T_3 ni à T_7 .

Tableau 17 : Facteurs d'induction moyens de 10 gènes de stress dans les branchies et la glande digestive des huîtres contaminées par du TBT par voie dissoute et trophique.

Fonction métabolique	Gène	Voie dissoute				Voie trophique			
		Branchies		Glande digestive		Branchies		Glande digestive	
		T ₃	T ₇	T ₃	T ₇	T ₃	T ₇	T ₃	T ₇
Réponse au stress oxydant	<i>gpx</i>	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>sod</i>	/	/	/	/	/	5,1	/	/
	<i>sodmt</i>	/	/	/	/	0,5	6,4	/	/
	<i>cat</i>	/	/	/	/	0,1	3,9	/	/
Système de détoxification	<i>mt1</i>	/	/	/	/	2,3	/	/	/
	<i>mt2</i>	/	/	/	/	3	/	2,1	/
	<i>mxr</i>	/	/	/	/	0,1	/	0,02	/
Métabolisation	<i>gst</i>	/	/	/	/	0,3	/	/	/
	<i>cyp1a1</i>	/	/	/	/	/	7,8	/	/
Métabolisme mitochondrial	<i>cox1</i>	/	/	3,8	/	2,1	/	/	/

/ = pas de différence significative entre la condition contaminée et son contrôle respectif d'après le test de Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$). *gpx*: glutathion peroxydase; *sod*: superoxyde dismutase cytosolique; *sodmt*: superoxyde dismutase mitochondriale; *cat*: catalase; *mt1*: métallothionéine isoforme 1; *mt2*: métallothionéine isoforme 2; *mxr*: multi-xénobiotique résistance protéine; *gst*: glutathion-s-transferase; *cyp1a1*: cytochrome P450-1A1; *cox1*: sous-unité 1 de la cytochrome-c-oxydase.

4.4. Discussion

Notre étude a montré que l'huître japonaise pouvait être contaminée par voie dissoute et trophique par le TBT. Ces travaux ont également mis en évidence des réponses biologiques associées au stress oxydant au niveau transcriptomique et au niveau de la protéine dans les branchies d'animaux contaminés par la nourriture.

La voie dissoute de contamination a mené à une bioaccumulation de TBT (données non présentées). Cette observation est en accord avec de précédentes études (Devier et al., 2003) et avec les caractéristiques chimiques lipophiles de ce contaminant (Pagliarani et al., 2013). Cependant, ces niveaux d'accumulation n'ont pas induit de variation significative des expressions géniques relatives, ce qui est en désaccord avec les données de la littérature (Park et al., 2009). Ces résultats peuvent être attribués au niveau environnemental d'exposition choisi ici (0,01 ppb) et au stress potentiellement induit par l'absence de nourriture. Il a déjà été montré que ce facteur pouvait induire une production de MTs (Amiard et al., 2006) ; il est par ailleurs connu pour impacter les caractéristiques physiologiques d'un organisme (Salem et al., 2007). Cela présente donc une bonne cohérence avec les niveaux élevés de MTs mesurés dans les branchies du contrôle dissous.

A l'inverse, les faibles concentrations mesurées dans les branchies des huîtres contaminées peuvent être associées à un effet potentiel du TBT sur la production de protéines au niveau post-traductionnel. Les organoétains sont en effet connus pour interagir avec l'ADN (Tanguy et al., 1999) et les biomolécules (Pagliarani et al., 2013), ce qui expliquerait les niveaux mesurés ici.

On peut raisonnablement supposer au regard des niveaux de MT dans les contrôles dissous que les organismes étaient stressés. Cela a pu contribuer à masquer la réponse génique face au TBT apporté par voie dissoute. Cette hypothèse souligne l'importance des conditions expérimentales lorsque des niveaux environnementaux de contamination sont appliqués.

La voie de contamination trophique a induit une bioaccumulation nette dans la glande digestive et dans les branchies dans une moindre mesure (données non présentées). C'est dans ce dernier organe que la réponse biologique la plus forte a été observée. La concentration en MTs y était deux fois plus importante que dans le contrôle associé, ce qui est en accord avec les expressions géniques relatives de *mt1* et *mt2* après 3 jours d'exposition. De plus, l'induction de *coxI* est cohérente avec les effets connus du TBT sur la mitochondrie (Fiorini et al., 2012). Cependant, d'après de précédentes études menées sur la moule, la cible mitochondriale de ce contaminant exclut un effet direct sur le complexe IV de la phosphorylation oxydative (Nesci et al., 2011). De plus, il semble peu probable que les organoétains puissent être pris en charge par les MTs du fait de l'encombrement stérique, ce qui exclut l'hypothèse de l'induction directe (Amiard et al., 2006). On peut donc proposer un mode d'action indirect du TBT sur les inductions géniques de *mt1*, *mt2* et *coxI*, basé sur une fixation non spécifique du contaminant. Puisque le TBT inhibe l'activité des deux premiers complexes de la phosphorylation oxydative (Nesci et al., 2011), une surexpression de *coxI* peut représenter un système compensatoire dans la mitochondrie afin de restaurer le transfert électronique. Le choc oxydant successif (Arnold, 2012) peut ainsi potentiellement causer des dommages cellulaires pouvant expliquer les inhibitions observées des gènes *gst*, *mrx*, *cat*, *sodmt* et les surexpressions de *mt1* et *mt2* impliqués dans la gestion des EROs (Ruttkey-Nedecky et al., 2013).

Le statut transcriptomique des huîtres contaminées après 7 jours d'exposition présente de fortes modifications, en lien avec la réponse adaptative des organismes. L'induction de *sod*, *sodmt* et *cat* est en effet associée à la réponse au stress oxydant. On observe par ailleurs une surexpression de *cyp1a1* dont le rôle dans la métabolisation des xénobiotiques est bien connu (Zanette et al., 2010). Ces observations peuvent être attribuées à une adaptation des huîtres suite au stress oxydant détecté après trois jours d'exposition. Nos résultats confirment donc la toxicité précoce et significative du TBT pour les huîtres à des niveaux environnementaux, mais indiquent également que ces organismes présentent la capacité de s'y adapter. De si faibles niveaux de contamination n'ont cependant pas permis d'observer une réponse dans la glande digestive, ce qui peut potentiellement être associé au niveau métabolique élevé de cet organe ; ce niveau était probablement suffisant pour gérer le stress induit par la contamination.

4.5. Conclusion

Les résultats toxicologiques présentés ici proviennent de travaux réalisés en complément d'une approche plutôt orientée sur l'aspect « chimie du TBT ». De nombreux résultats non présentés ici, et représentant le cœur de cette étude, concernent en effet la répartition cellulaire du TBT, sa dégradation dans les organes d'intérêt (DBT et MBT) ainsi que sa complexation avec des biomolécules par des analyses en spectrométrie de masse.

Il a tout de même semblé pertinent de critiquer la toxicité du TBT à de si faibles niveaux de concentrations par une approche biomarqueurs. Les outils employés ici relèvent du stress général, mais ont tout de même permis de mettre en évidence l'apparition d'un stress oxydant chez des organismes exposés au TBT à des concentrations de l'ordre du ng/L.

Deux points importants peuvent être dégagés de nos résultats, en lien avec les deux voies de contaminations étudiées :

1) De manière générale, les résultats obtenus dans les conditions de contamination dissoute présentent une incohérence notable avec la littérature comme précisé dans la discussion (aucune induction/répression génique significative). Une hypothèse importante est associée au très faible niveau de contamination auquel les organismes ont été soumis. En dépit d'une toxicité avérée du TBT, il est probable par ailleurs que les conditions expérimentales aient contribué à partiellement masquer la réponse induite par le contaminant. Ce type de phénomène est bien connu puisque la gamétogenèse ou les variations thermiques, qui sont des processus naturels, sont susceptibles d'altérer/masquer les réponses biologiques face aux contaminants comme nos études de terrain l'ont montré.

2) Les réponses biologiques observées face aux conditions de contamination trophique présentent un intérêt notoire. La réponse biologique la plus forte a été observée dans les branchies, ce qui peut être associé au rôle de cet organe dans la fonction de nutrition. L'apport de nourriture a pu par ailleurs diminuer le stress lié aux conditions expérimentales ce qui a permis de détecter les effets du TBT à des concentrations aussi faibles. Les glandes digestives en revanche n'ont pas montré de réponse biologique importante, car cet organe est connu chez les mollusques pour son niveau métabolique de base élevé. Nous l'observons au niveau des expressions géniques relatives ou de la production de métallothionéines, qui y sont en général plus importantes. On peut donc supposer que les niveaux environnementaux adoptés ici n'ont pas suffi à moduler l'activité antioxydante de cet organe. Ce type d'observation souligne les capacités antioxydantes naturellement élevées de l'huître en lien avec son adaptabilité naturelle face à des stress quotidiens importants tels que la succession des marées (écarts thermiques majeurs, alternance entre l'eau et l'air...).

En termes de perspectives de travail, nous pouvons affirmer que le TBT à des concentrations de l'ordre du ng/L induit un stress oxydant. Il serait cependant nécessaire de confirmer nos résultats par la reproduction de l'expérience dans des conditions plus proches de celles du milieu naturel : adapter les niveaux nutritifs à ceux trouvés dans la lagune par exemple.

5. Conclusion de l'approche expérimentale

5.1. Bilan des observations réalisées

Les travaux réalisés au laboratoire dans le cadre de cette thèse ont permis d'apporter certains éléments de réponses concernant les effets des polluants du bassin d'Arcachon sur l'huître japonaise (Figure 94). Trois types de contaminants (pesticides, HAPs, TBT) ont été choisis en se basant sur les constats réalisés dans le milieu naturel.

HAP	Pest. et Cu	TBT
<u>Huîtres</u>		
2n (~46 g, pf) et 3n (~41 g, pf) Grand Banc	Diploïde (24 mois) Arguin	Diploïde (18 mois) Grand Banc
<u>Voie de contamination</u>		
Trophique	Dissoute	Trophique et Dissoute
<u>Concentrations appliquées</u>		
$\Sigma \sim 4,4 \mu\text{g/g, ps}$	$\Sigma \sim 3,7 \mu\text{g/L}$ et $2,4 \mu\text{g/L}$	$< 10 \text{ ng/L}$
<u>Durée de l'exposition</u>		
21 jours	14 jours	7 jours
<u>Effets principaux observés</u>		
Bioacc. 3n > Bioacc. 2n 2n : Réponse adaptative et 3n : légère toxicité (répressions géniques)	Répressions géniques modérées dans les branchies et la glande digestive face au mélange pesticides + cuivre	Contamination par les deux voies Stress oxydant par voie trophique dans les branchies

Figure 94 : Résumé des principaux effets observés sur l'huître durant les différentes approches expérimentales.

Bien qu'actuellement interdit d'utilisation, le TBT semble encore présent dans la lagune à l'état de trace (ordre du ng/L). La toxicité reconnue de ce composé nous a donc incités à étudier la toxicité de ce contaminant dans des conditions de contamination de la lagune. Deux voies de contamination ont été utilisées : la voie dissoute et la voie trophique. Les réponses observées par contamination trophique indiquent une toxicité précoce du contaminant dans les branchies, impliquée dans la capture des matières en suspension nutritives. Les organismes semblent présenter les signes d'une réponse adaptative en lien avec les faibles niveaux de contamination observés et « l'histoire des animaux ». La faible réponse observée dans les glandes digestives en dépit de la voie de contamination employée est attribuée au niveau métabolique élevé de cet organe, dont les défenses sont potentiellement suffisantes pour gérer un tel niveau de stress. La voie de contamination dissoute, pourtant effective au regard des niveaux de bioaccumulation observés, ne semble pas associée à une quelconque réponse adaptative.

L'expérience menée par la suite avec les pesticides (8 composés) et le cuivre en mélange, se base sur les mesures de pesticides réalisées dans les eaux de la lagune et les niveaux élevés de cuivre constatés dans les organismes du suivi terrain. Ces expositions ont révélé une interaction entre ces deux types de composés qui induisent en mélange une réponse différente de la simple somme des effets isolés. En effet, le mélange de pesticides seul, ou le cuivre seul, semblent induire une réponse adaptative caractérisée par des inductions géniques transitoires ou des hausses du niveau de métallothionéines. En revanche, des répressions géniques ont été observées, indiquant un effet délétère du mélange sur le statut transcriptomique des huîtres. Ces réponses biologiques demeurent modérées et en lien avec les faibles concentrations appliquées.

Enfin l'exposition réalisée avec les HAPs se base sur les niveaux de contamination observés dans la lagune. Une contamination supérieure dans la partie orientale de la lagune a été observée dans les organismes, associée à une contamination non négligeable du microphytobenthos dont l'huître peut potentiellement se nourrir. En accord avec ces observations et les propriétés physico-chimiques des HAPs, une exposition par voie trophique a été réalisée sur des organismes diploïdes et triploïdes en complément de nos approches de terrain. Il semblerait qu'hors période de reproduction, les huîtres triploïdes présentent une sensibilité supérieure caractérisée par des répressions géniques et des niveaux de bioaccumulation supérieurs, alors que les huîtres diploïdes présentent les signes d'une réponse adaptative (hausse des MTs et inductions géniques).

5.2. Les limites de l'approche expérimentale

Les trois expériences en laboratoire étudiées séparément permettent d'étudier la toxicité de chaque classe de contaminants indépendamment. Il est cependant primordial de considérer le fait que les huîtres du bassin d'Arcachon sont exposées perpétuellement à un mélange de ces composés. L'exposition aux pesticides et au cuivre a prouvé les capacités d'interactions des polluants entre eux, on peut donc raisonnablement s'attendre à ce type de processus dans le milieu naturel.

Nous précisons par ailleurs en introduction que la pertinence des approches expérimentale est fortement tributaire de la qualité de reproduction des conditions de vie naturelles en laboratoire. Cependant, de nombreuses contraintes techniques ne permettent pas d'adopter les pratiques idéales pour atteindre cet objectif.

Il est par exemple difficile de nourrir les organismes en étudiant la voie de contamination dissoute sans risquer l'adsorption des composés sur les particules. La privation de nourriture sur de courtes périodes au profit d'une stabilité des concentrations représente donc un compromis technique dont il faut tenir compte dans l'interprétation des données.

De la même manière, certains paramètres tels que le dosage des contaminants organiques requièrent d'importantes quantités de tissus, ce qui peut induire une densité de population importante en début de cinétique dans les unités expérimentales et un stress lié à la production de déchets non négligeable.

L'utilisation de composés peu miscibles dans l'eau nous a également conduits à employer un solvant organique. Bien que les proportions aient été inférieures à 0,1% et qu'un contrôle adéquat ait été réalisé, des interférences avec la réponse aux contaminants peuvent être attendues.

De manière plus générale, il est commun pour ce type d'approches d'utiliser de l'eau de mer synthétique lorsqu'aucun dispositif de prélèvement et de filtration d'eau de mer n'est accessible. Bien que l'eau utilisée pour reconstituer l'eau de mer synthétique aie subi un « vieillissement » pour s'affranchir des effets potentiels du chlore, il est clair que la composition dissoute de cette eau diffère de celle du milieu naturel, notamment en termes de matière organique dissoute. On ne peut donc exclure un effet de ce milieu sur la physiologie des huîtres.

Il convient enfin de mentionner le rôle du stade de développement et de l'histoire des organismes utilisés. Les huîtres employées dans nos expériences sont systématiquement issues des zones les moins contaminées de la baie (Arguin ou Grand Banc). Cependant dans un contexte de « mortalités estivales » récurrentes, on peut raisonnablement supposer que les organismes utilisés sont issus de lignées relativement « résistantes » puisqu'elles ont été produites dans le bassin par reproduction naturelle. Ce facteur limite les extrapolations aux organismes issus d'autres zones ostréicoles mais demeure pertinente dans le cadre de nos travaux concernant le bassin d'Arcachon. Cependant, de nouvelles expérimentations sont nécessaires pour statuer à un niveau plus fondamental sur la réponse de l'huître japonaise en général.

Comme cela a été évoqué dans les discussions respectives des articles précédents, l'effet des polluants sur l'huître creuse est un sujet vaste qui a été étudié sur de nombreux stades de développement et sur des organismes issus de divers milieux. Si les organismes juvéniles (naissain ou larves) présentent des sensibilités supérieures aux contaminants de façon générale, nos travaux en revanche indiquent que des individus adultes présentent au contraire une forte capacité d'adaptation, en lien avec leur histoire et une potentielle hérédité dans la résistance aux polluants.

5.3. Apports et perspectives de l'approche expérimentale

En conclusion les expériences menées au laboratoire ont permis de constater que des huîtres adultes issues du bassin d'Arcachon présentaient une forte capacité d'adaptation face à des niveaux de contamination équivalents à ceux de la lagune. Comme cela a été souligné dans les discussions des articles, l'huître est un organisme présentant de grandes capacités d'adaptation et des défenses antioxydantes évoluées, en lien avec son mode de vie sur les estrans qui la soumet à de forts écarts de températures réguliers, et à des phases d'émersion prolongée. Ses caractéristiques écologiques lui ont d'ailleurs valu le statut d'espèce invasive dans certaines régions (Troost, 2010). Ces éléments nous permettent d'affirmer que la pollution **seule** de la lagune présente un danger limité pour l'huître japonaise adulte.

Cependant, comme nous l'avons souligné, les contaminants ont été employés de façon isolée et sur de courtes durées dans un souci de compréhension des mécanismes de défense impliqués chez l'huître. Nous pouvons par ailleurs supposer que les effets observés sous-estiment dans une certaine mesure la réelle toxicité des polluants du fait de biais expérimentaux inhérents à l'approche en laboratoire.

En croisant ces observations avec celles faites sur le terrain, nous ne pouvons donc pas exclure une interaction des polluants avec les processus de gamétogenèse durant la période estivale par exemple. Les effets les plus délétères observés durant nos expérimentations sont associés à des répressions

géniques, qui ont été observés presque systématiquement durant la période estivale sur les organismes prélevés dans la lagune.

Des éléments de réponse plus solides pourraient donc être apportés en simulant la gamétogenèse au laboratoire comme cela a déjà été réalisé (Béguet, 2012). L'exposition d'organismes à différents niveaux de maturité sexuelle nous indiquerait si les polluants présentent un effet délétère supérieur sur des organismes en fonction de leur stade reproductif.

Il semble par ailleurs nécessaire de normaliser les pratiques expérimentales concernant les organismes (âge, origine, poids, parenté...) afin d'améliorer la reproductivité des expériences et de permettre des comparaisons plus pertinentes d'une étude à l'autre.

Enfin les biomarqueurs employés durant nos travaux dénotent d'une réponse face à un stress général et ne nous permettent pas de cibler les mécanismes précis mis en jeu dans la toxicité de ces polluants. Dans le cas de contaminants organiques aussi diversifiés que les pesticides par exemple, il semblerait pertinent d'approfondir les capacités de métabolisation de l'huître et les processus de toxicité associés. L'outil métabolomique, bien qu'émergent, présente donc une certaine pertinence face à de telles problématiques (Bouhifd et al., 2013; Van Aggelen et al., 2010; Viant, 2007). De la même manière, nous avons principalement travaillé à l'échelle du transcriptome, mais nous possédons peu d'informations sur le statut protéomique des organismes exposés. La toxicité étant également conditionnée par la capacité des contaminants à traverser les membranes biologiques, il paraît pertinent d'adopter une approche orientée sur l'aspect chimique. La réactivité des polluants entre eux, la formation potentielle de complexes avec la matière organique et les voies d'entrée précises des contaminants étudiés présentent encore des lacunes qu'il est nécessaire de combler pour appréhender pleinement les conditions d'exposition réelles des huîtres aux polluants.

Conclusion générale

Les travaux réalisés durant cette étude avaient pour objectif principal de répondre aux questions suivantes :

Quel est l'état de contamination chimique de la lagune ? Quels sont les contaminants et compartiments les plus concernés ?

Cette contamination représente-t-elle un risque pour l'ostréiculture dans le contexte de crise actuel ?

Pour apporter des éléments de réponses à ces interrogations, une double approche *in situ* et expérimentale a été déployée. Cette conclusion a pour objectif de résumer les résultats principaux et leur interprétation afin de statuer sur ces problématiques. Enfin, les perspectives de recherche pour approfondir le sujet seront exposées.

1. L'état des lieux de la contamination de la lagune

La base de notre étude repose sur un bilan de la pollution du bassin d'Arcachon. Pour cela, deux projets de recherche financés par la région Aquitaine ont permis la mise en place d'opérations de transplantation d'huîtres sur le terrain pendant plus de 3 années consécutives. Les 6 stations étudiées ont été choisies stratégiquement par rapport à leur position dans la lagune et leur proximité de sources potentielles de contamination.

Les principaux résultats de cette approche indiquent d'importantes différences de contamination du compartiment biotique en fonction du contaminant et de la station étudiés (Figure 95). Le **zinc**, en tant que métal essentiel impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques (Salgueiro et al., 2000) est retrouvé dans les huîtres à des concentrations élevées allant de 200 à presque 500 µg/g, pf (Tableau 18). Sa faible toxicité ne lui vaut aucune classification par les instances sanitaires (Bisson et al., 2005a). Nos travaux semblent indiquer que les niveaux de zinc dans les huîtres du bassin d'Arcachon sont stables depuis une dizaine d'année. Une contamination légèrement plus élevée est observable dans les zones les plus internes de la lagune, ce qui peut être associé à l'hydrodynamisme. L'activité nautique peut représenter une source additionnelle de ce métal puisqu'il est utilisé dans les anodes sacrificielles des bateaux (Mottin et al., 2012). **Les valeurs mesurées sont du même ordre de grandeur que la médiane nationale.**

Le **cadmium** à l'inverse, est un métal dont la toxicité est bien renseignée (Bisson et al., 2011) et qui présente de faibles niveaux dans la croûte terrestre. **Ses concentrations dans les huîtres du bassin sont très faibles depuis une dizaine d'année et ne dépassent pas les 0,4 µg/g, pf dans les huîtres entières, ce qui est largement inférieur au seuil de 1 µg/g, pf** (Commission Européenne, 2006) au-

delà duquel toute production ou pêche de coquillage est interdite. Nous avons constaté par ailleurs de façon récurrente des concentrations en Cd supérieures aux niveaux habituels (3 – 4 µg/g, ps) dans les glandes digestives des organismes transplantés près des passes de la lagune (Figure 95). Une contamination « annuelle » par voie trophique est supposée puisque les concentrations tendent à diminuer par dilution pondérale après l'été. Les sources de ce métal demeurent cependant inconnues et d'autres études sont nécessaires pour éclaircir de point.

Le **cuivre** finalement, présente un intérêt particulier dans le cadre de notre étude puisque ce métal est surveillé par le ROCCH depuis qu'une augmentation de sa concentration dans les tissus des huîtres a été détectée depuis les années 80 (Ifremer, 2010). Bien que ce métal soit un élément essentiel comme le zinc (Festa et Thiele, 2011), sa toxicité pour les organismes chlorophylliens lui vaut une utilisation dans les peintures antisalissures des coques des bateaux (Claisse et Alzieu, 1993). Le bruit de fond géochimique des sables landais est marqué par la présence naturelle de cuivre dans la lagune (Bouchet et al., 1997c). L'étude intégrée du bassin d'Arcachon réalisée en 1997 rapporte notamment des concentrations mesurées dans l'eau à l'occasion de diverses études ponctuelles allant d'environ 1 à 10 µg Cu/L. Les concentrations les plus élevées étaient mesurées dans les ports, ce qui constitue potentiellement une preuve de l'impact des activités nautiques sur la présence de ce métal. Nos résultats sont cohérents avec ce constat puisqu'**un gradient croissant de contamination dans les tissus des organismes transplantés est observable de l'extérieur de la lagune vers les stations les plus orientales** (Figure 95). Les sites abritant une activité nautique importante telles que **le Tès ou Eyrac sont par ailleurs les deux seuls à présenter des médianes de concentrations supérieures aux médianes nationales 2003-2007 établies par le ROCCH** (Tableau 18). Les niveaux supérieurs relevés dans les branchies semblent indiquer une contamination par voie dissoute.

Concernant la contamination par les **polluants organiques**, les **HAPs** ont été mesurées systématiquement dans les organismes transplantés sur des ensembles d'une vingtaine d'huîtres lyophilisées et homogénéisées. Les concentrations en fluoranthène en ng/g, ps ont été reportées dans le Tableau 18. De la même manière les concentrations en B(a)P et en $\sum [B(a)A + B(b,j,k)F + B(a)P + \text{Triph}/\text{Chrys}]^6$ ont été indiquées dans le Tableau 18 après conversion en ng/g, pf (application d'un facteur de 0,2 (Ifremer, 2010) afin de les comparer aux normes établies par l'UE⁷).

Nos résultats indiquent pour le fluoranthène une concentration dans les organismes de l'ordre de la médiane nationale entre 2003 et 2007. **Les sites abritant une activité nautique importante tels que Bélisaire, Ile aux oiseaux, et particulièrement le Tès et Eyrac présentent cependant des niveaux supérieurs à cette médiane** ce qui peut potentiellement indiquer un effet des activités nautiques. Les stations les plus internes de manière générale semblent également plus impactées (Figure 95), ce qui

⁶ Pour des raisons techniques liées à la séparation chromatographique des composés, le tableau 9 indique la $\sum [B(a)A + B(b,j,k)F + B(a)P + \text{Triphène}/\text{Chrysène}]$ ce qui surévalue légèrement la concentration réelle en $[B(a)A + B(a)P + B(b)F + \text{Chrysène}]$ mais autorise une comparaison.

⁷ Ces normes (Commission Européenne, 2011b, 2006) établissent des limites dans les tissus des bivalves pour le B(a)P de 5 ng/g, pf (environ 25 ng/g, ps) et pour $\sum [B(a)A + B(a)P + B(b)F + \text{Chrys}]$ de 30 ng/g, pf (environ 150 ng/g, ps).

est également observable au niveau des médianes de B(a)P et de $\sum [B(a)A + B(b,j,k)F + B(a)P + \text{Triph/Chrys}]$. Ces deux derniers critères montrent notamment un rapprochement entre les valeurs mesurées au Tès et à Eyrac et les normes européennes, ce qui souligne les effets de l'hydrodynamisme de la lagune sur la rétention des contaminants.

Médianes	2003-2007 (ROCCH)		2009-2010		2010-2011	2011-2012
	Nationale	Arcachon	ASCOBAR année 2	OSQUAR année 1	OSQUAR année 2	
Cu ($\mu\text{g/g}$, pf)	41	Cap Ferret	Arguin	24	15	14
		25	Bélisaire	35	30	24
		Les Jacquets	Grand Banc	22	21	24
		40	Ile aux oiseaux	30	23	32
		Comprian	Le Tès	46	41	45
		41	Eyrac	80	53	87
Zn ($\mu\text{g/g}$, pf)	453	Cap Ferret	Arguin	377	256	197
		437	Bélisaire	399	417	249
		Les Jacquets	Grand Banc	372	307	316
		485	Ile aux oiseaux	425	291	341
		Comprian	Le Tès	513	442	398
		535	Eyrac	473	443	373
Cd ($\mu\text{g/g}$, pf)	0,32	Cap Ferret	Arguin	0,19	0,28	0,25
		0,36	Bélisaire	0,17	0,28	0,24
		Les Jacquets	Grand Banc	0,16	0,28	0,29
		0,22	Ile aux oiseaux	0,13	0,23	0,27
		Comprian	Le Tès	0,16	0,25	0,30
		0,32	Eyrac	0,17	0,25	0,28
Fluoranthène (ng/g, ps)	27	Cap Ferret	Arguin	14	19	15
		38	Bélisaire	27	26	27
		Les Jacquets	Grand Banc	28	19	21
		57	Ile aux oiseaux	36	29	35
		Comprian	Le Tès	34	36	34
		43	Eyrac	35	38	37
Benzo(a)pyrène (ng/g, pf)	/	/	Arguin	0,42	0,34	0,15
		/	Bélisaire	1,18	0,56	0,58
		/	Grand Banc	0,58	0,46	0,36
		/	Ile aux oiseaux	1,39	0,73	1,17
		/	Le Tès	1,61	1,60	1,80
		/	Eyrac	1,02	0,75	1,75
$\sum [B(a)A + B(a)P + B(b,j,k)F + \text{Triph/Chrys}]$ (ng/g, pf)	/	/	Arguin	7,26	5,15	7,56
		/	Bélisaire	14,64	13,35	12,83
		/	Grand Banc	13,74	9,86	12,87
		/	Ile aux oiseaux	20,90	20,94	22,78
		/	Le Tès	21,93	26,65	23,17
		/	Eyrac	24,77	26,23	25,98

Tableau 18 : Médianes des concentrations en contaminants mesurées dans les huîtres issues du terrain – comparaison entre les données du ROCCH et celles des projets région Aquitaine.

Note importante : les médianes du ROCCH pour le Cu, Zn, Cd et les médianes ASCOBAR/OSQUAR pour le BaP et la \sum HAPs étaient initialement exprimées par rapport à la matière sèche. Un facteur moyen multiplicatif de 0,2 a été appliqué en accord avec les pratiques du ROCCH (Ifremer, 2010) pour exprimer les valeurs par rapport à la matière fraîche. Cette opération permet de comparer les travaux du réseau et ceux de notre étude entre eux, mais aussi de comparer les concentrations aux normes de l'UE dans les bivalves (Commission Européenne, 2011b, 2006).

Notre étude nous a également permis de confirmer les observations de Crespo (2009) concernant les HAPs. Ces composés sont présents de façon marginale dans la colonne d'eau à l'état dissous, dans des concentrations de l'ordre de la dizaine de ng par litre, y compris en été qui est une période de fréquentation nautique importante (Le Berre et al., 2010) dans la lagune. Les sédiments présentent une très forte hétérogénéité spatiale (de la dizaine de ng/g, ps à plusieurs µg/g, ps) dans leur contamination en HAPs, associée aux variations de granulométrie et des teneurs en carbone organique. Le compartiment nutritif de l'huître est vraisemblablement contaminé de manière significative (plusieurs centaines de ng/g, ps).

Les variations saisonnières de bioaccumulation sont difficiles à interpréter puisque les concentrations mesurées dépendent de nombreux paramètres. La mesure de la bioaccumulation est un outil classique en écotoxicologie pour critiquer la contamination d'un milieu, mais elle répond à un équilibre dynamique complexe (Zhou et al., 2008) associé à des variables biotiques (âge, sexe, taux de filtration, voie de contamination, dépuración, stockage...) et abiotiques (spéciation du contaminant, interactions entre polluants, température...). De manière globale on peut cependant affirmer grâce aux approches statistiques multivariées que **les variations de masse sont déterminantes dans la concentration des polluants** (dilution pondérale en cas de croissance ou potentielle concentration en cas de perte de poids). Ces modulations sont cependant atténuées dans un environnement plus contaminé comme c'est le cas dans les stations les plus orientales.

2. Quelle réponse des huîtres face à cette contamination ?

2.1. Les constats faits sur le terrain

L'étude de la contamination chimique de la lagune a été accompagnée du suivi durant trois ans de paramètres supplémentaires : la concentration en métallothionéines, les expressions géniques différentielles de 10 gènes impliqués dans la réponse au stress, et les paramètres de croissance (masse, longueur de coquille et indices de condition).

Le milieu naturel présente une variabilité importante ce qui rend le déterminisme des réponses observées difficile à appréhender (Munkittrick et McCarty, 1995). Cependant, certaines tendances ont pu être isolées, notamment en ce qui concerne la **croissance** des organismes étudiés (Figure 95). De manière générale, les masses de corps mou et les longueurs de coquilles les plus importantes sont obtenues au niveau des sites sous influence océanique (Arguin, Bélisair et Grand Banc). Les données du SOMLIT utilisées durant notre étude n'ont pas permis d'identifier de différences entre ces zones et les zones les plus internes concernant les apports nutritifs (chlorophylle a). De telles différences dans les niveaux de croissance pourraient donc être expliquées par des apports trophiques non tracés par ce paramètre, mais pourraient également **refléter un effet de la qualité chimique du milieu**. Il est reconnu qu'en situation de stress modéré, les organismes aquatiques allouent une part supérieure d'énergie au maintien des fonctions physiologiques de base et à leur protection (réparation des

cassures de l'ADN, production de protéines de protection...) au détriment de processus tels que la croissance et la reproduction (Sokolova et al., 2012). Cette théorie est corroborée par les **niveaux élevés de métallothionéines mesurés dans les huîtres issues des stations orientales (Figure 95), qui sont corrélés aux concentrations en cuivre et en HAPs**. Cette dernière observation est par ailleurs cohérente avec le rôle de ces protéines dans la lutte contre la contamination métallique ou la gestion du stress oxydant (Capdevila et al., 2012).

Les **métallothionéines** ont néanmoins présenté des **variations saisonnières identiques** à celles des **indices de conditions** dans certains cas, notamment lors de l'étude en été 2012 et dans une moindre mesure durant la seconde année du programme ASCOBAR (Figure 95). La résolution cinétique des travaux *in situ* OSQUAR n'a pas permis de détecter ces chutes dans les valeurs en été du fait de prélèvements trop espacés dans le temps. Ces événements coïncident avec les émissions gamétiques et se caractérisent par des pertes de masses brusques (**chute des IC**) et des **diminutions drastiques des concentrations en métallothionéines**. Ces processus sont décrits dans la littérature et semblent démontrer un **transfert des protéines parentales vers les embryons** à des fins de protection et de régulation des métaux essentiels (Mao et al., 2012).

Les **expressions géniques relatives** des 10 gènes étudiés n'ont pas permis de spatialiser la réponse transcriptomique des huîtres en lien avec la contamination chimique. Comme précisé en introduction, l'outil génomique présente une sensibilité très importante (Nikinmaa et Rytönen, 2012) et les niveaux d'ARNm peuvent être modulés par de nombreux facteurs sur le terrain, non liés à la pollution (Farcy et al., 2007). Bien que ce biomarqueur présente une forte variabilité d'une année sur l'autre, certaines tendances récurrentes ont pu être identifiées telles que de **faibles niveaux transcriptomiques en été et des niveaux plus élevés en hiver**. Il est probable que **les températures élevées de l'été, associées à la demande énergétique de la reproduction réduisent l'allocation d'énergie à la protection antioxydante**. Cette hypothèse est cohérente avec les observations faites chez des organismes « sensibles » aux mortalités estivales qui semblent présenter des capacités de défense diminuées durant la période de frai (Samain, 2011). A l'inverse, nos observations soulignent des **expressions géniques supérieures en hiver potentiellement liées à une réponse antioxydante face à la présence de polluants apportés par le lessivage du bassin versant** (ex : pesticides (Belles, 2012)).

Il semble donc que l'on observe une **saisonnalité de la réponse génique** (Figure 95) à l'échelle du bassin. La contamination supérieure des zones internes de la lagune n'est cependant pas suffisante pour que les organismes modifient leur niveau d'expression génique de manière durable. L'huître japonaise présente en effet des capacités d'adaptations importantes en lien avec son écologie en zone intertidale (Troost, 2010) et son système antioxydant performant (Béguel et al., 2013). Les réponses géniques demeurent donc transitoires au niveau local mais se pérennisent au niveau saisonnier ce qui permet leur détection.

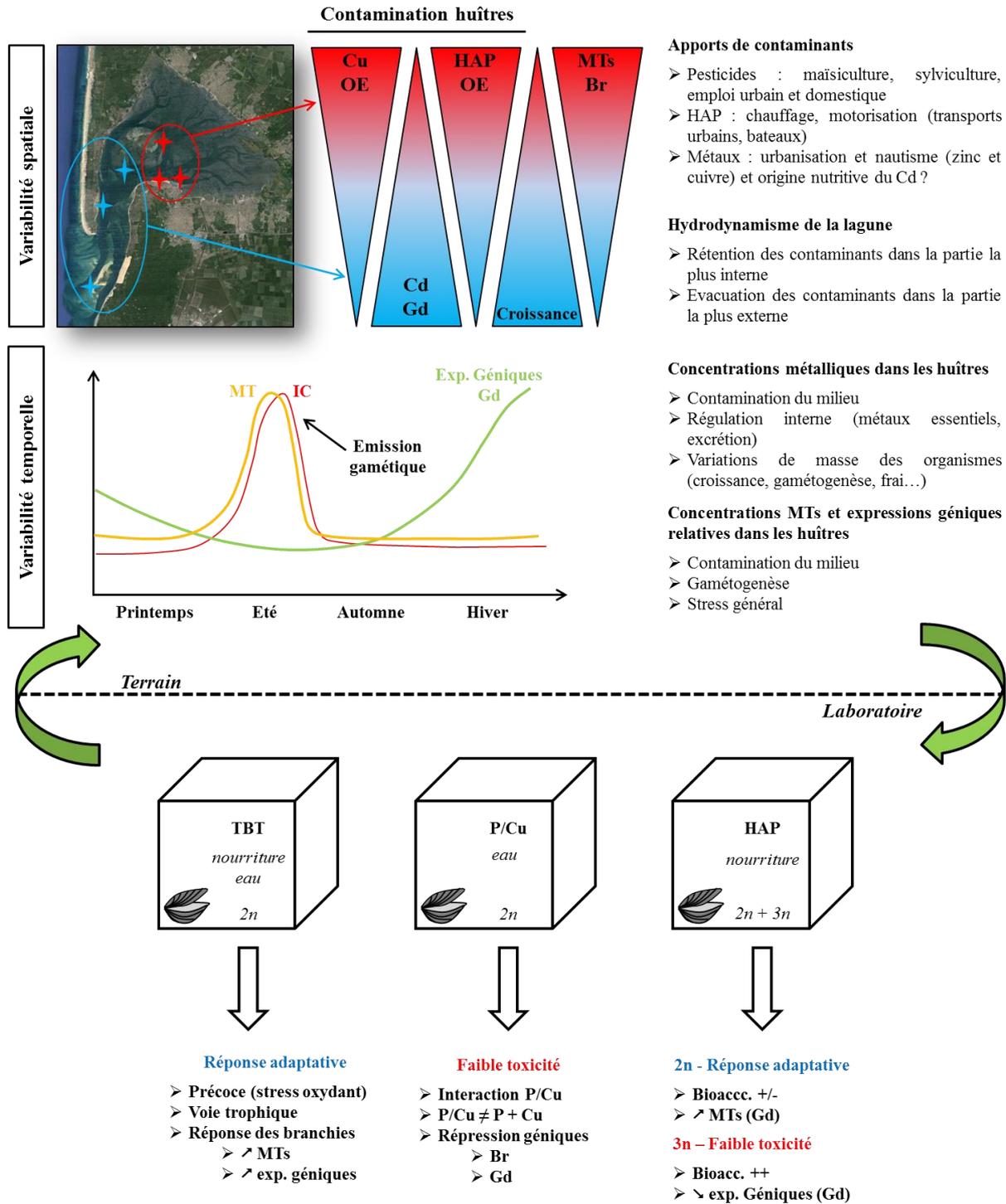


Figure 95 : Bilan des principaux résultats obtenus lors des approches *in situ* et expérimentales.

NB : OE – Organisme Entier ; Br – Branchies ; Gd – Glande digestive ; MT – Méthallothionéines ; IC – Indices de Condition ; Exp. Géniques – Expressions géniques ; TBT – Tributylétain ; HAP – Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques ; P/Cu – Pesticides/Cuivre ; 2n – diploïdes ; 3n – triploïdes ; Bioacc. – Bioaccumulation.

2.2. Les résultats de l'approche expérimentale

Le déterminisme complexe des réponses biologiques sur le terrain a requis la mise en place d'expérimentations en conditions contrôlées (Beketov et Liess, 2012) dans le but d'isoler les effets des contaminants majeurs de la lagune.

Le **TBT** notamment présente une toxicité importante pour les huîtres (Alzieu et Heral, 1984) et sa persistance à l'état de trace dans la lagune semble encore induire l'imposex chez les gastéropodes (*Ocenebra erinaceus*) comme en atteste le suivi annuel réalisé dans le cadre de la convention OSPAR (Toxem, 2012). Nous avons pu montrer que des huîtres adultes issues du bassin d'Arcachon pouvaient potentiellement se contaminer par voie dissoute comme trophique. Cette dernière a induit une **réponse adaptative de la part des organismes exposés** (Figure 95) au niveau des branchies à des niveaux très faibles (< 5 ng TBT/L), ce qui souligne le potentiel impact de ce polluant dans les conditions de contamination de la lagune.

Les travaux de (Belles, 2012) associés aux observations faites dans les huîtres du terrain pendant ces travaux nous ont par ailleurs conduits à étudier la réponse biologique induite par les produits phytosanitaires. Un **mélange représentatif de pesticides organiques et de cuivre** a été employé au laboratoire, et les résultats suggèrent une **interaction entre ces deux types de contaminants**. Le mélange a en effet induit des **répressions géniques potentiellement dues à un stress oxydant modéré**, tandis que les contaminations isolées ont induit des surexpressions géniques plutôt assimilables à une réponse adaptative. Nous avons également pu constater que la présence des pesticides avait favorisé la bioaccumulation de cuivre. Les réponses biologiques observées dans nos conditions expérimentales restent cependant très modérées, ce qui est à mettre en lien avec le passé des organismes exposés (issus du bassin d'Arcachon) et les niveaux environnementaux adoptés. Il est important de noter que les mêmes contaminants ont présenté des effets délétères dans des conditions proches sur les stades juvéniles de *C. gigas* (Mai et al., 2013, 2012).

Enfin les observations faites *in situ* et les travaux de (Crespo, 2009) nous ont également mené à réaliser une dernière expérimentation de contamination avec un **mélange de HAPs** par voie trophique. Des huîtres diploïdes et triploïdes ont été utilisées pour ces travaux ; **le premier modèle a présenté une réponse adaptative** potentiellement en lien avec l'histoire des organismes tandis que **le second modèle a présenté des répressions géniques associées aux effets d'un stress oxydant**. Ces effets délétères étaient associés à des niveaux supérieurs de bioaccumulation des polluants, ce qui a été mis en lien avec des taux de filtrations (Garnier-Gere et al., 2002; Hawkins et al., 2000) et une métabolisation des HAPs potentiellement plus élevés chez les triploïdes. Ces observations complètent bien l'approche de terrain menée en été 2012 durant la période de reproduction ; les triploïdes n'avaient pas montré de contamination supérieure dans le temps par rapport au modèle diploïde. On peut donc conclure qu'une pollution par les HAPs en période de gamétogenèse ou en période de repos n'aura pas les mêmes effets sur l'huître adulte.

De manière globale, les approches en laboratoire ont souligné la toxicité très modérée des contaminants testés séparément dans les gammes de concentration du bassin d'Arcachon. Il est

tout de même important de rappeler que ces résultats concernent des conditions expérimentales particulières et des organismes issus de la lagune, ce qui signifie que les effets toxiques mesurés sont potentiellement sous-évalués, mais néanmoins représentatifs de la situation dans les eaux du bassin d'Arcachon. De plus, ces contaminants ont été testés de façon isolée, alors que les huîtres sont exposées dans la nature à des mélanges complexes. Nous ne pouvons donc pas statuer de manière catégorique sur les effets réels de ces polluants sur le terrain.

3. Perspectives de recherche

Nos travaux consistent en une approche globale du fonctionnement du bassin d'Arcachon. Le champ d'investigation est large, concernant plusieurs compartiments mais aussi plusieurs types de contaminants (métalliques et organiques). Certains points ont pu être approfondis par les approches expérimentales, néanmoins des interrogations persistent et méritent une attention particulière dans l'avenir.

Concernant les approches *in situ*

Les résultats obtenus sur le terrain relatifs à la contamination métallique du milieu se résument à un suivi de la bioaccumulation. L'organotropisme nous indique que le cuivre et le zinc sont principalement accumulés dans les branchies, mais nous ne disposons pas des informations liées à l'exposition des organismes. En effet, le rôle des activités nautiques est largement discuté dans nos travaux, et un effort devrait être fourni afin de mieux cadrer les conséquences de cette activité sur la qualité chimique du bassin d'Arcachon.

Il serait donc intéressant de faire l'état des lieux de la contamination de la colonne d'eau, des particules et des sédiments au niveau des diverses stations étudiées pour le cuivre et le zinc. Des sites supplémentaires au niveau des ports et des zones principalement concernées par le nautisme devraient également être ajoutées afin de diagnostiquer les conséquences réelles de cette activité sur le relargage de métaux, composés antialgues ou HAPs. Ce type de suivi pourrait être réalisé par la mise en place d'échantillonneurs passifs ((Abou Mrad, 2011; Belles, 2012)) qui présentent l'avantage d'intégrer toutes les variations de concentrations dans le milieu sur une période, à l'inverse des prélèvements ponctuels qui rendent compte de l'état chimique du compartiment étudié à un instant donné.

Dans ce contexte, nous avons détecté par ailleurs une « anomalie » dans la contamination en cadmium des glandes digestives des huîtres issues des stations les plus océaniques de notre étude. Ces pics de contamination récurrents en été poussent à s'interroger sur l'origine du métal, surtout durant une période de forte croissance pendant laquelle des chutes par dilution pondérale seraient plutôt attendues. Le cadmium devrait potentiellement être étudié dans le compartiment particulière de ces

zones, afin de déceler un éventuel apport nutritif, bien qu'il ne présente actuellement aucun danger à l'échelle du bassin.

Les réponses biologiques mesurées ne concernent ici que deux biomarqueurs. D'une part les métallothionéines et d'autre part les expressions géniques relatives. Ces protéines et les gènes choisis pour la qPCR sont des indicateurs de stress assez génériques et leur induction est multiple. Pour faire un lien fonctionnel entre les modulations de ces marqueurs et la réponse à une contamination chimique, certains indicateurs devraient être employés en complément tels que la peroxydation lipidique (effet des EROs) ou les activités enzymatiques associées aux gènes étudiés (SOD, CAT, GPX...). Les paramètres hématocytaires liés à l'immunité pourraient également être employés (Gagnaire et al., 2007) pour détecter le stress subi par les organismes.

De manière générale d'autres outils permettraient potentiellement de cibler les effets associés à certaines familles de contaminants. Ces approches d'écotoxicogénomique deviennent d'autant plus pertinentes à l'heure actuelle puisque le génome de l'huître a été entièrement séquencé (Zhang et al., 2012) ce qui permet la mise au point d'outils spécifiques tels que les puces à ADN. La protéomique chez les bivalves présente un essor important depuis les années 2000 (Campos et al., 2012) et complète les approches de transcriptomiques qui ne renseignent pas sur la fonction en elle-même (présence/absence de la protéine).

Finalement, un des biais principaux liés aux approches écotoxicologiques est le fait « qu'on ne trouve que ce que l'on cherche ». Il est évident pourtant que le milieu naturel contient des mélanges de polluants aux effets encore insoupçonnés. Un des moyens les plus actuels pour s'affranchir de ce biais réside dans les approches dites EDA (Effect-Directed Analyses). Schématiquement, cette méthode permet d'isoler par chromatographie différentes fractions d'un extrait liquide (issu d'une matrice solide ou liquide) en fonctions de leurs propriétés chimiques (polarité par exemple). Ces fractions sont ensuite testées *in vitro* et celles qui induisent un effet toxique sont caractérisées chimiquement afin de retrouver le composé actif toxique (Dévier et al., 2011; Hecker and Hollert, 2009).

Un point intéressant enfin serait d'approfondir les recherches concernant le déterminisme du passé de l'animal sur sa réponse biologique. Transplanter dans le bassin d'Arcachon des huîtres issues de diverses origines permettrait d'élucider cet aspect et d'apporter des éléments de réponse concernant les faibles réponses observées au laboratoire. L'étude de l'héritabilité d'une résistance aux contaminants devrait par ailleurs être assortie d'une approche épigénétique (Head et al., 2012; Vandegheuchte et Janssen, 2013, 2011).

De même, étudier les effets toxiques des contaminants étudiés ici sur des stades précoces de développement présenterait un fort intérêt dans le contexte actuel de mortalités estivales. Bien que les adultes testés ici n'aient pas présenté une sensibilité importante aux polluants testés à des doses

environnementales, on ne peut exclure par ailleurs un impact sur l'effort de reproduction et/ou la « qualité » et la quantité des gamètes produits dans le milieu.

Concernant l'approche expérimentale

Certains points ont été abordés précédemment pour l'approche *in situ*, notamment en ce qui concerne l'utilisation de nouveaux biomarqueurs plus pertinents et sensibles en fonction de la classe de contaminant étudiée (approches « omiques »).

Nos résultats expérimentaux ont permis de mettre en évidence des réponses très modérées en lien avec les faibles niveaux de contamination adoptés. Dans ce contexte, le stress lié aux conditions expérimentales présente un réel problème puisqu'il est susceptible de dissimuler une partie de la réponse au polluant. De plus, pour des raisons logistiques nous n'avons pas toujours pu travailler avec des organismes du même âge et présentant les mêmes caractéristiques (masse, longueur...).

Il semble donc pertinent pour l'avenir de standardiser de manière rigoureuse les pratiques au laboratoire : travailler avec des organismes ayant les mêmes caractéristiques, la même histoire. Si possible, un système de renouvellement de l'eau en flux continu est également recommandé afin de se rapprocher au plus près des conditions du milieu naturel.

Comme précédemment exposé, il semble aussi pertinent d'approfondir l'interaction entre la reproduction et la contamination chez les huîtres. Pour cela des techniques permettant d'inhiber la maturation des gonades existent (Béguel et al., 2013). Ces pratiques permettraient d'obtenir plusieurs lots d'huîtres de même origine à des stades de maturité différents. Leur exposition à des mélanges de contaminants représentatifs du bassin d'Arcachon nous indiquerait si les processus liés à la gamétogenèse altèrent de façon importante la réponse aux polluants.

Il semble enfin intéressant de s'intéresser à la spéciation des polluants dans les conditions physico-chimiques retrouvées dans le bassin d'Arcachon. Nos approches expérimentales bien que représentatives quantitativement, ne peuvent résumer à elles-seules les mécanismes réels de toxicité retrouvés dans la lagune. La toxicité d'un composé est en grande partie tributaire de sa capacité à traverser les membranes biologiques, et ainsi des conditions du milieu. Le pH, l'oxygène, la lumière, la présence de sédiment, de matière organique dissoute ou particulaire, sont autant de paramètres susceptibles de modifier la « forme » du contaminant et par cela ses voies d'entrée dans les organismes. Comprendre ces mécanismes de manière plus fine pourrait nous aider à développer des modèles prédictifs en se basant sur les conditions physico-chimiques du milieu et la concentration du contaminant dans l'eau par exemple.

Bibliographie

- Abou Mrad, N., 2011. Développements méthodologiques pour l'échantillonnage et l'analyse des hydrocarbures dans les systèmes aquatiques: Application dans des expérimentations en conditions semi-contrôlées et dans le milieu environnemental. Thèse Dr. l'université Bordeaux I. 440 p.
- Absil, M.C.P., Berntssen, M., Gerringa, L.J.A., 1996. The influence of sediment, food and organic ligands on the uptake of copper by sediment-dwelling bivalves. *Aquat. Toxicol.* 34, 13–29.
- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.-P., 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat. Toxicol.* 67, 347–57.
- Achard-Joris, M., Gonzalez, P., Marie, V., Baudrimont, M., Bourdineaud, J.-P., 2006. Cytochrome c oxydase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves. *Biometals* 19, 237–44.
- AFSSA, 2003. Afssa – Saisine n° 2003-SA-0007 Maisons.
- Akcha, F., Burgeot, T., Budzinski, H., Pfohl-Leszkowicz, A., Narbonne, J.F., 2000a. Induction and elimination of bulky benzo[a]pyrene-related DNA adducts and 8-oxodGuo in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed *in vivo* to B[a]P-contaminated feed. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 205, 195–206.
- Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., Narbonne, J.F., 2000b. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 49, 269–287.
- Akcha, F., Spagnol, C., Rouxel, J., 2012. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquat. Toxicol.* 106-107, 104–13.
- Alunno-Bruscia, M., Bourlès, Y., Maurer, D., Robert, S., Mazurié, J., Gangnery, A., Gouilletquer, P., Pouvreau, S., 2011. A single bio-energetics growth and reproduction model for the oyster *Crassostrea gigas* in six Atlantic ecosystems. *J. sea Res.* 66, 340–348.
- Alzieu, C., 1998. Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. *Ocean Coast. Manag.* 40, 23–36.
- Alzieu, C., 2000a. Environmental impact of TBT : the French experience. *Sci. Tot. Env.* 258, 99–102.
- Alzieu, C., 2000b. Impact of Tributyltin on Marine Invertebrates. *Ecotoxicology* 9, 71–76.
- Alzieu, C., Heral, M., 1984. Ecotoxicological effects of organotin compounds on oyster culture. *Ecotoxicological Test. Mar. Environ.* 2, 187–196.
- Alzieu, C., Heral, M., Dreno, J.P., 1989. Les peintures marines antisalissures et leur impact sur l'ostréiculture. *Equinoxe*.
- Alzieu, C., Thibaud, Y., Heral, M., Boutier, B., 1980. Evaluation des Risques dus a l'emploi des Peintures Anti-Salissures Dans les Zones Conchylicoles. *Rev. des Trav. l'Institut des Pêches Marit.* 44, 305–348.

- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160–202.
- Anderson, R.S., Patel, K.M., Roesijadi, G., 1999. Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger: implications for hemocyte defense responses. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 443–9.
- Arini, A., Baudrimont, M., Feurtet-Mazel, A., Coynel, A., Blanc, G., Coste, M., Delmas, F., 2011. Comparison of periphytic biofilm and filter-feeding bivalve metal bioaccumulation (Cd and Zn) to monitor hydrosystem restoration after industrial remediation: a year of biomonitoring. *J. Environ. Monit.* 13, 3386–98.
- Arnold, S., 2012. The power of life-cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and survival. *Mitochondrion* 12, 46–56.
- Auby, I., Bost, C.-A., Budzinski, H., Dalloyau, S., Desternes, A., Belles, A., Trut, G., Plus, M., Pere, C., Couzi, L., Feigne, C., Steinmetz, J., 2011. Régression des herbiers de zostères dans le Bassin d'Arcachon : état des lieux et recherche des causes.
- Auby, I., Labourg, J.-P., 1996. Seasonal dynamics of *Zostera noltii* hornem. in the bay of arcachon (France). *J. Sea Res.* 35, 269–277.
- Auby, I., Trut, G., D'Amico, F., Beliaeff, B., 1999. Réseau hydrologique du Bassin d'Arcachon - Synthèse des résultats 1988 - 1997.
- Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Le Floch, S., Renault, T., 2008. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Tox. In Vitro* 22, 1610–7.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., Finkel, T., 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483–95.
- Balamurugan, K., Schaffner, W., 2006. Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 737–46.
- Bard, S., 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 48, 357–389.
- Barillé, L., Bougrier, S., Geairon, P., Robert, J.M., 1994. Alimentation expérimentale de l'huître *Crassostrea gigas* à l'aide de navicules bleus *Haslea ostrearia* (Simonsen) de différentes tailles. *Oceanol. Acta* 17, 201–210.
- Barillé, L., Lerouxel, A., Dutertre, M., Haure, J., Barillé, A.-L., Pouvreau, S., Alunno-Bruscia, M., 2011. Growth of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in a high-turbidity environment: Comparison of model simulations based on scope for growth and dynamic energy budgets. *J. Sea Res.* 66, 392–402.
- Barker, T., 2007. Climate Change 2007 : An Assessment of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Change, Synthesis Report 446, 12–17.
- Barranger, A., Akcha, F., Rouxel, J., Brizard, R., Maurouard, E., Pallud, M., Menard, D., Tapie, N., Budzinski, H., Burgeot, T., Benabdelmouna, A., 2014. Study of genetic damage in the Japanese oyster induced by an environmentally-relevant exposure to diuron: Evidence of vertical transmission of DNA damage. *Aquat. Toxicol.* 146, 93–104.
- Baudrimont, M., Andres, S., Durrieu, G., Boudou, A., 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. *Aquat. Toxicol.* 63, 89–102.

- Baudrimont, M., Lemaire-Gony, S., Ribeyre, F., Métivaud, J., Boudou, A., 1997. Seasonal Variations of Metallothionein Concentrations in the Asiatic Clam (*Corbicula fluminea*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 118, 361–367.
- Baudrimont, M., Schäfer, J., Marie, V., Maury-Brachet, R., Bossy, C., Boudou, A., Blanc, G., 2005. Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Medoc salt marshes (Gironde estuary, France). *Sci. Tot. Env.* 337, 265–80.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., 1997. Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry: application to mussels. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 359, 502–509.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., 1998a. PAHs in Arcachon Bay, France: origin and biomonitoring with caged organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 577–586.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Raoux, C., Bellocq, J., Thompson, S., Barth, H., Walker, C.H., Narbonne, J.F., Bellocq, J., 2001. Comparative study of sediment and mussel aromatic compound content in European coastal environments. Relationship with specific biomarkers, in: *Biomarkers in Marine Organisms: A Practical Approach*. pp. 131–177.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T., Bellocq, J., 1998b. Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 951–960.
- Bayen, S., Kee Lee, H., Philip Obbard, J., 2007. Exposure and response of aquacultured oysters, *Crassostrea gigas*, to marine contaminants. *Environ. Res.* 103, 375–82.
- Béguel, J.-P., 2012. Etude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l’huître creuse *Crassostrea gigas*. Thèse Univ. Bretagne Occident. pp. 167.
- Béguel, J.-P., Huvet, A., Quillien, V., Lambert, C., Fabioux, C., 2013. Study of the antioxidant capacity in gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in link with its reproductive investment. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 157, 63–71.
- Beketov, M.A., Liess, M., 2012. Ecotoxicology and macroecology - time for integration. *Environ. Pollut.* 162, 247–54.
- Bellas, J., 2006. Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. *Sci. Tot. Env.* 367, 573–85.
- Belles, A., 2012. Improvement and field application of the passive samplers in aquatic ecosystems. Thèse Dr. l’université Bordeaux 1. 470 p.
- Bendell, L.I., Feng, C., 2009. Spatial and temporal variations in cadmium concentrations and burdens in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) sampled from the Pacific north-west. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1137–43.
- Bernard, I., De Kermoysan, G., Pouvreau, S., 2011. Effect of phytoplankton and temperature on the reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Investigation through DEB theory. *J. Sea Res.* 66, 349–360.
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M., 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 125, 359–69.

- Beyer, J., Petersen, K., Song, Y., Ruus, A., Grung, M., Bakke, T., Tollefsen, K.E., 2013. Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: a discussion paper. *Mar. Environ. Res.* 1–11.
- Bisson, M., Diderich, R., Houeix, N., Hulot, C., Lacroix, G., Lefevre, J.P., Leveque, S., Magaud, H., Morin, A., 2005a. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : le zinc et ses dérivés. INERIS. 69 p.
- Bisson, M., Diderich, R., Houeix, N., Hulot, C., Lacroix, G., Lefevre, J.P., Leveque, S., Magaud, H., Morin, A., Pepin, G., Pichard, A., 2011. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : le cadmium et ses dérivés. INERIS. 82 p.
- Bisson, M., Heuze, G., Lacroix, G., Lefevre, J.P., Magaud, H., Malleret, L., 2005b. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : Indéno(1,2,3, c, d)Pyrène. INERIS. 35 p.
- Bisson, M., Houeix, N., Gay, G., Lacroix, G., Lefevre, J.P., Magaud, H., Migne, V., Morin, A., Tissot, S., 2005c. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : le cuivre et ses dérivés. INERIS. 66 p.
- Blanchet, H., De Montaudouin, X., Chardy, P., Bachelet, G., 2005. Structuring factors and recent changes in subtidal macrozoobenthic communities of a coastal lagoon, Arcachon Bay (France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 64, 561–576.
- Boitsov, S., Jensen, H.K.B., Klungsøyr, J., 2009. Natural background and anthropogenic inputs of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in sediments of South-Western Barents Sea. *Mar. Environ. Res.* 68, 236–45.
- Botta, F., Lavison, G., Couturier, G., Alliot, F., Moreau-Guigon, E., Fauchon, N., Guery, B., Chevreuil, M., Blanchoud, H., 2009. Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. *Chemosphere* 77, 133–9.
- Böttger, R., Feibicke, M., Schaller, J., Dudel, G., 2013. Effects of low-dosed imidacloprid pulses on the functional role of the caged amphipod *Gammarus roeseli* in stream mesocosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93, 93–100.
- Bouchet, J.-M., Deltreil, J.-P., Manaud, F., Maurer, D., Trut, G., 1997a. Etude intégrée du Bassin d’Arcachon - Tome V. Arcachon.
- Bouchet, J.-M., Deltreil, J.-P., Manaud, F., Maurer, D., Trut, G., Auby, I., Dreno, J.-P., L’Yavanc, J., Masson, N., Pellier, C., 1997b. Etude intégrée du bassin d’Arcachon - Tome I. Arcachon.
- Bouchet, J.-M., Deltreil, J.-P., Manaud, F., Maurer, D., Trut, G., Auby, I., Dreno, J.-P., L’Yavanc, J., Masson, N., Pellier, C., 1997c. Etude intégrée du bassin d’Arcachon - Tome II. Arcachon.
- Bougrier, S., Geairon, P., Jonquikres, G., Bather, C., 1995. Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 134, 143–154.
- Bouhifd, M., Hartung, T., Hogberg, H.T., Kleensang, A., Zhao, L., 2013. Review: toxicometabolomics. *J. Appl. Toxicol.* 33, 1365–83.
- Bouilly, K., Bonnard, M., Gagnaire, B., Renault, T., Lapègue, S., 2007. Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 58–63.

- Boury, M., 1954. L'oeuvre de Jean Coste et le développement de l'ostréiculture. International Council for the Exploration of the Sea.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004a. Characterisation and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. *Mar. Biol.* 146, 53–64.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004b. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, 147–57.
- Boyden, C.R., Phillips, D.J.H., 1981. Seasonal variation and inherent variability of trace elements in oysters and their implications for indicator studies. *Mar. Ecol. - Prog. Ser.* 5, 29–40.
- Brandão-Neto, J., Stefan, V., Berenice Mendonça, B., Bloise, W., Ana Valéria Castro, B., 1995. The essential role of zinc in growth. *Nutr. Res.* 15, 335–358.
- Brignon, J.-M., 2005. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : tributylétain. INERIS. 18 p.
- Brignon, J.-M., Malherbe, L., Soleille, S., 2004. Les substances dangereuses prioritaires de la directive cadre sur l'eau - Fiches de données technico-économiques.
- Buck, K.N., Ross, J.R.M., Russell Flegal, a, Bruland, K.W., 2007. A review of total dissolved copper and its chemical speciation in San Francisco Bay, California. *Environ. Res.* 105, 5–19.
- Bustamante, P., Luna-Acosta, A., Clemens, S., Cassi, R., Thomas-Guyon, H., Warnau, M., 2012. Bioaccumulation and metabolisation of (14)C-pyrene by the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed via seawater. *Chemosphere* 87, 938–44.
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169–93.
- Byrne, R.H., Kump, L.R., Cantrell, K.J., 1988. The influence of temperature and pH on trace metal speciation in seawater. *Mar. Chem.* 25, 163–181.
- Campos, A., Tedesco, S., Vasconcelos, V., Cristobal, S., 2012. Proteomic research in bivalves: towards the identification of molecular markers of aquatic pollution. *J. Proteomics* 75, 4346–59.
- Canton, M., Anschutz, P., Coynel, A., Polsenaere, P., Auby, I., Poirier, D., 2010. Nutrient export to an Eastern Atlantic coastal zone: first modeling and nitrogen mass balance. *Biogeochemistry* 107, 361–377.
- Capdevila, M., Bofill, R., Palacios, Ò., Atrian, S., 2012. State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century. *Coord. Chem. Rev.* 256, 46–62.
- Capinera, J.L., 2010. Pest Management and its effects on Wildlife, in: *Insects and Wildlife - Arthropods and Their Relationships with Wild Vertebrate Animals*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Carlisle, S.M., Trevors, J.T., 1988. Glyphosate in the environment. *Water, Air Soil Pollut.* 39, 409–420.
- Carrasco Navarro, V., Leppänen, M.T., Kukkonen, J.V.K., Godoy Olmos, S., 2013. Trophic transfer of pyrene metabolites between aquatic invertebrates. *Environ. Pollut.* 173, 61–7.

- Castel, J., Caumette, P., Herbert, R., 1996. Eutrophication gradients in coastal lagoons as exemplified by the Bassin d'Arcachon and the Etang du Prévost. *Hydrobiologia* 329, 9–27.
- Chapman, P.M., 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 7–15.
- Chaty, S., Rodius, F., Vasseur, P., 2004. A comparative study of the expression of CYP1A and CYP4 genes in aquatic invertebrate (freshwater mussel, *Unio tumidus*) and vertebrate (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 69, 81–94.
- Chesworth, J.C., Donkin, M.E., Brown, M.T., 2004. The interactive effects of the antifouling herbicides Irgarol 1051 and Diuron on the seagrass *Zostera marina* (L.). *Aquat. Toxicol.* 66, 293–305.
- Cho, E.-S., Jeong, H.-D., 2012. Effect of environmental impact to molecular expression of heat-shock protein (HSP70) in oyster *Crassostrea gigas* from Gamak bay, Korea. *J. Environ. Biol.* 33, 609–15.
- Choi, Y.K., Jo, P.G., Choi, C.Y., 2008. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 147, 286–292.
- Christie, J.C., Bendell, L.I., 2009. Sources of dietary cadmium to the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 68, 97–105.
- Cima, F., Bragadin, M., Ballarin, L., 2008. Toxic effects of new antifouling compounds on tunicate haemocytes I. Sea-nine 211 and chlorothalonil. *Aquat. Toxicol.* 86, 299–312.
- Cima, F., Craig, P.J., Harrington, C., 2003. Organotin Compounds in the Environment, in: Craig, P.J. (Ed.), *Organometallic Compounds in the Environment*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 101–149.
- Claisse, D., Alzieu, C., 1993. Copper contamination as a result of antifouling paint regulations? *Mar. Pollut. Bull.* 26, 395–397.
- Cochennec-Laureau, N., Baud, J.-P., 2008. Assessment of excess mortality in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) since 2008. *Bull. épidémiologique, santé Anim. Aliment.* 42, 2–5.
- Cochennec-Laureau, N., Baud, J.-P., Bedier, E., Boudry, P., Huvet, A., Nicolas, J.-L., Pepin, J.-F., Petton, B., 2010. Bilan des « Journées Surmortalité des huîtres creuses, *Crassostrea gigas* » du Programme P7 « Aquaculture Durable » des 8 et 9 décembre 2009, in: « Journées Surmortalité Des Huîtres Creuses Du Programme P7 » 2009.
- Collin, H., Meistertzheim, A.-L., David, E., Moraga, D., Boutet, I., 2010. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Thunberg 1793, to pesticide exposure under experimental conditions. *J. Exp. Biol.* 213, 4010–4017.
- Collotta, M., Bertazzi, P.A., Bollati, V., 2013. Epigenetics and pesticides. *Toxicology* 307, 35–41.
- Comité National de la Conchyliculture (CNC), 2011. <http://www.cnc-france.com/> (accessed 11.25.13).
- Commission des Communautés européennes, 2002. Directive 2002/62/CE de la Commission du 9 juillet 2002 portant neuvième adaptation au progrès technique de l'annexe I de la directive 76/769/CEE du Conseil. *J. Off. des Communautés Eur.* du 12.07.2002 (JO L 183/58). 2 p.
- Commission des Communautés Européennes, 2007. Décision de la Commission du 13 juin 2007 concernant la non-inscription du diuron à l'annexe I de la directive 91/414/CEE du Conseil et le

- retrait des autorisations de produits phytopharmaceutiques contenant cette substance. J. Off. des Communautés Eur. du 16.6.2007 (JO L 156/32). 2 p.
- Commission Européenne, 2006. Règlement (UE) N° 1881/2006 de la commission du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. J. Off. l'Union Eur. du 20.12.2006 (JO L 364/5). 20 p.
- Commission Européenne, 2011a. Règlement (UE) N° 494/2011 de la commission du 20 mai 2011 modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques. J. Off. l'Union Eur. du 21.5.2011 (JO L 134/2). 4 p.
- Commission Européenne, 2011b. Règlement (UE) N° 835/2011 de la commission du 19 août 2011 modifiant le règlement (CE) n° 1881/2006 en ce qui concerne les teneurs maximales pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les denrées alimentaires. J. Off. l'Union Eur. du 20.8.2011 (JO L 215/4). 5 p.
- Commission Européenne Eurostat, 2013. Production de l'aquaculture à l'exception des écloséries et nurseries (à partir de 2008) <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/fisheries/data/database> (accessed 12.5.13).
- Conseil de l'Union Européenne, 1998. Directive 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Journal officiel des Communautés européennes du 5.12.1998.
- Costanza, R., Arge, R., Groot, R. De, Farberk, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., Neill, R.V.O., Paruelo, J., Raskin, R.G., Suttonkk, P., 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387, 253–260.
- Cotter, E., Malham, S.K., O'Keeffe, S., Lynch, S.A., Latchford, J.W., King, J.W., Beaumont, A.R., Culloty, S.C., 2010. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of growth, biochemistry and gametogenesis. *Aquaculture* 303, 8–21.
- Craig, P.J., 2003. Organometallic Compounds in the Environment, in: Craig, P.J. (Ed.), Occurrence and Pathways of Organometallic Compounds in the Environment. John Wiley & Sons, Ltd.
- Crespo, A., 2009. Présence et sources des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le Bassin d'Arcachon. Thèse Dr. l'université Bordeaux 1. 458 p.
- Cycoń, M., Markowicz, A., Borymski, S., Wójcik, M., Piotrowska-Seget, Z., 2013. Imidacloprid induces changes in the structure, genetic diversity and catabolic activity of soil microbial communities. *J. Environ. Manage.* 131, 55–65.
- David, E., Tanguy, A., Moraga, D., 2007. Peroxiredoxin 6 gene: a new physiological and genetic indicator of multiple environmental stress response in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 84, 389–398.
- David, E., Tanguy, A., Pichavant, K., Moraga, D., 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS J.* 272, 5635–5652.
- De Perre, C., Le Ménach, K., Ibalot, F., Parlanti, E., Budzinski, H., 2013. Development of solid-phase microextraction to study dissolved organic matter—Polycyclic aromatic hydrocarbon interactions in aquatic environment. *Anal. Chim. Acta* 807, 51–60.
- De Toledo-Silva, G., Siebert, M.N., Medeiros, I.D., Sincero, T.C.M., Moraes, M.O., Goldstone, J. V., Bainy, A.C.D., 2008. Cloning a new cytochrome P450 isoform (CYP356A1) from oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 66, 15–8.

- Demin, O.V., Kholodenko, B.N., Skulachev, V.P., 1998. A model of O₂-generation in the complex III of the electron transport chain. *Mol. Cell. Biochem.* 184, 21–33.
- Deng, X., Gao, K., Sun, J., 2012. Physiological and biochemical responses of *Synechococcus* sp. PCC7942 to Irgarol 1051 and diuron. *Aquat. Toxicol.* 122–123, 113–9.
- Devier, M.-H., Augagneur, S., Budzinski, H., Le Menach, K., Mora, P., Narbonne, J.F., Garrigues, P., 2005. One-year monitoring survey of organic compounds (PAHs, PCBs, TBT), heavy metals and biomarkers in blue mussels from the Arcachon Bay, France. *J. Environ. Monit.* 7, 224–240.
- Devier, M.-H., Augagneur, S., Budzinski, H., Mora, P., Narbonne, J.F., Garrigues, P., 2003. Microcosm tributyltin bioaccumulation and multibiomarker assessment in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2679–2687.
- Dévier, M.-H., Mazellier, P., Aït-Aïssa, S., Budzinski, H., 2011. New challenges in environmental analytical chemistry: Identification of toxic compounds in complex mixtures. *Comptes Rendus Chim.* 14, 766–779.
- Dissanayake, A., Galloway, T.S., Jones, M.B., 2008. Physiological responses of juvenile and adult shore crabs *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda) to pyrene exposure. *Mar. Environ. Res.* 66, 445–50.
- Donnelly, K.C., Naufal, Z.S., 2010. Toxic and Genotoxic Effects of Mixtures of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, in: Mumtaz, M. (Ed.), Principles and Practice of Mixtures Toxicology. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Dubois, S., Savoye, N., Grémare, A., Plus, M., Charlier, K., Beltoise, A., Blanchet, H., 2012. Origin and composition of sediment organic matter in a coastal semi-enclosed ecosystem: An elemental and isotopic study at the ecosystem space scale. *J. Mar. Syst.* 94, 64–73.
- Duffus, J.H., 2002. “Heavy metals” - a meaningless term. *Pure Appl. Chem.* 74, 793–807.
- Eisenreich, S.J. (JRC), Bernasconi, C., Camprostrini, P., De Roo, A., George, G., Heiskanen, A.-S., Hjorth, J., Hoepffner, N., Jones, K.C., Noges, P., Pirrone, N., Runnals, N., Somma, F., Stilanakis, N., Umlauf, G., Van De Bund, W., Viaroli, P., Vogt, J., Zaldivar, J.-M., Algieri, A., Beaugrand, G., Bidoglio, G., Blenckner, T., Bouraoui, F., Cinnirella, S., Cole, G., Cornell, S., Demuth, S., Dokulil, M., Giordani, G., Hedgecock, I., Lavelle, C., Marsh, T., Mostajir, B., Niemeyer, S., Nykjaer, L., Raes, F., Reynard, N., Straile, D., Thielen, J., Tomasin, A., Trombino, G., 2005. Climate change and the European water dimension. Ispra, Italy.
- Ellis, S.R., Hodson, M.E., Wege, P., 2010. The soil-dwelling earthworm *Allolobophora chlorotica* modifies its burrowing behaviour in response to carbendazim applications. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1424–8.
- Ellwood, M.J., Van den Berg, C.M.G., 2000. Zinc speciation in the Northeastern Atlantic Ocean. *Mar. Chem.* 68, 295–306.
- Enríquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., Pennec, M., 2008. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquac. Int.* 17, 491–506.
- FAO, 2013. Fisheries Statistics. Global Aquaculture Production 1950-2011 [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/fr> (accessed 12.5.13).
- Farcy, E., Voiseux, C., Lebel, J.-M., Fievet, B., 2007. Seasonal changes in mRNA encoding for cell stress markers in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to radioactive discharges in their natural environment. *Sci. Tot. Env.* 374, 328–41.

- Fauvelle, V., 2012. Evaluation de la contamination en pesticides des tributaires du bassin d'Arcachon et développement d'un échantillonneur passif spécifique des herbicides anioniques. Thèse Dr. l'université Bordeaux I. 257 p.
- Festa, R.A., Thiele, D.J., 2011. Copper: an essential metal in biology. *Curr. Biol.* 21, 877–83.
- Fiorini, R., Pagliarani, A., Nesci, S., Pirini, M., Tucci, E., Ventrella, V., 2012. Structural and functional changes in gill mitochondrial membranes from the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to Tri-N-butyltin. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 877–884.
- Fisker, K.V., Holmstrup, M., Sørensen, J.G., 2013. Variation in metallothionein gene expression is associated with adaptation to copper in the earthworm *Dendrobaena octaedra*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 157, 220–6.
- Fleury, E., Huvet, A., 2012. Microarray analysis highlights immune response of Pacific oysters as a determinant of resistance to summer mortality. *Mar. Biotechnol.* 14, 203–217.
- Fleury, E., Moal, J., Boulo, V., Daniel, J.-Y., Mazurais, D., Hénaut, A., Corporeau, C., Boudry, P., Favrel, P., Huvet, A., 2010. Microarray-based identification of gonad transcripts differentially expressed between lines of Pacific oyster selected to be resistant or susceptible to summer mortality. *Mar. Biotechnol.* 12, 326–39.
- Frantzen, M., Falk-Petersen, I.-B., Nahrgang, J., Smith, T.J., Olsen, G.H., Hangstad, T.A., Camus, L., 2012. Toxicity of crude oil and pyrene to the embryos of beach spawning capelin (*Mallotus villosus*). *Aquat. Toxicol.* 108, 42–52.
- Fridovich, I., 2009. Oxidative Stress, in: *Encyclopedia of Life Science (ELS)*. Chichester, pp. 1–7.
- Fujii, J., Taniguchi, N., 1999. Down regulation of superoxide dismutases and glutathione peroxidase by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic. Res.* 31, 301–308.
- Gagnaire, B., Gay, M., Huvet, A., Daniel, J.-Y., Saulnier, D., Renault, T., 2007. Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: *in vivo* effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquat. Toxicol.* 84, 92–102.
- Gagnaire, B., Soletchnik, P., Madec, P., Geairon, P., Le Moine, O., Renault, T., 2006. Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture* 254, 606–616.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, T., Renault, T., 2006. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biol. Toxicol.* 22, 1–14.
- Ganthy, F., 2011. Rôle des herbiers de zostères (*Zostera noltii*) sur la dynamique sédimentaire du Bassin d'Arcachon. Thèse Dr. l'université Bordeaux I. 1–284.
- Garnier-Gere, P.H., Naciri-Graven, Y., Bougrier, S., Magoulas, A., Heral, M., Kotoulas, G., Hawkins, A., Gerard, A., 2002. Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in contrasting natural environments. *Mol. Ecol.* 11, 1499–1514.
- Geffard, A., Geffard, O., Amiard, J.C., His, E., Amiard-Triquet, C., 2007. Bioaccumulation of metals in sediment elutriates and their effects on growth, condition index, and metallothionein contents in oyster larvae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 57–65.

- Geffard, O., Geffard, A., His, E., Budzinski, H., 2003. Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 481–90.
- Géret, F., Jouan, A., Turpin, V., Joao Bebianno, M., Cosson, R.P., 2002. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Living Resour.* 15, 61–66.
- Glé, C., Amo, Y., Del, Bec, B., Sautour, B., Froidefond, J., 2007. Typology of environmental conditions at the onset of winter phytoplankton blooms in a shallow macrotidal coastal ecosystem, Arcachon bay (France). *J. Plankton Res.* 29, 999–1014.
- Glé, C., Del Amo, Y., Sautour, B., Laborde, P., Chardy, P., 2008. Variability of nutrients and phytoplankton primary production in a shallow macrotidal coastal ecosystem (Arcachon Bay, France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 76, 642–656.
- Glozier, N.E., Struger, J., Cessna, A.J., Gledhill, M., Rondeau, M., Ernst, W.R., Sekela, M.A., Cagampan, S.J., Sverko, E., Murphy, C., Murray, J.L., Donald, D.B., 2012. Occurrence of glyphosate and acidic herbicides in select urban rivers and streams in Canada, 2007. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 19, 821–34.
- Goetz, M.E., Luch, A., 2008. Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett.* 266, 73–83.
- Gouletquer, P., Joly, J., Gérard, A., Le, E., Moriceau, J., Peignon, J., Heurtebise, S., Phelipot, P., 1996. Performance of triploid Pacific Oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg) reared in high carrying capacity ecosystem: survival, growth and proximate biochemical composition. *Haliotis* 25, 1–12.
- Graceli, J.B., Sena, G.C., Lopes, P.F.I., Zamprogno, G.C., Da Costa, M.B., Godoi, A.F.L., Dos Santos, D.M., De Marchi, M.R.R., Dos Santos Fernandez, M.A., 2013. Organotins: a review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate. *Reprod. Toxicol.* 36, 40–52.
- Gregorc, A., Evans, J.D., Scharf, M., Ellis, J.D., 2012. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). *J. Insect Physiol.* 58, 1042–9.
- Grune, T., Catalgol, B., Jung, T. (Eds.), 2013. Oxidative stress and protein oxidation, in: *Protein Oxidation and Aging*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 1–214.
- Guéguen, M., Baron, R., Bardouil, M., Haberkorn, H., Soudant, P., Truquet, P., Lassus, P., 2012. Influence of *Crassostrea gigas* (Thunberg) sexual maturation stage and ploidy on uptake of paralytic phycotoxins. *Toxicol. Off. J. Int. Soc. Toxicol.* 60, 40–3.
- Guo, S., Qian, L., Shi, H., Barry, T., Cao, Q., Liu, J., 2010. Effects of tributyltin (TBT) on *Xenopus tropicalis* embryos at environmentally relevant concentrations. *Chemosphere* 79, 529–533.
- Guo, W., He, M., Yang, Z., Lin, C., Quan, X., Wang, H., 2007. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, suspended particulate matter and sediment from Daliao River watershed, China. *Chemosphere* 68, 93–104.
- Guo, Y.-W., Zhang, Y., Huang, X., Gao, K.-S., Wang, K.-J., Ke, C.-H., Huang, H.-Q., 2012. Proteomic analysis of dimethoate-responsive proteins in the oyster (*Saccostrea cucullata*) gonad. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 19, 2248–58.
- Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Guéguen, M., Moal, J., Palacios, E., Lassus, P., Soudant, P., 2010. Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 97, 96–108.

- Hall, L.W., Anderson, R.D., 1999. A Deterministic Ecological Risk Assessment for Copper in European Saltwater Environments. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 207–218.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1–14.
- Hannam, M.L., Bamber, S.D., Galloway, T.S., John Moody, A., Jones, M.B., 2010. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. *Chemosphere* 78, 779–84.
- Hansford, R., 2002. Oxidative Phosphorylation, in: *Encyclopedia of Life Science (ELS)*. Chichester, pp. 1–8.
- Haq, F., 2003. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 533, 211–226.
- Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R., 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18, 45–51.
- Haure, J., Huvet, A., Palvadeau, H., Nourry, M., Penisson, C., Martin, J.L.Y., Boudry, P., 2003. Feeding and respiratory time activities in the cupped oysters *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* and their hybrids. *Aquaculture* 218, 539–551.
- Haure, J., Penisson, C., Bougrier, S., Baud, J.P., 1998. Influence of temperature on clearance and oxygen consumption rates of the flat oyster *Ostrea edulis*: determination of allometric coefficients. *Aquaculture* 169, 211–224.
- Hawkins, A.J.S., Magoulas, A., Héral, M., Bougrier, S., Naciri-Graven, Y., Day, A.J., Kotoulas, G., 2000. Separate effects of triploidy, parentage and genomic diversity upon feeding behaviour, metabolic efficiency and net energy balance in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genet. Res.* 76, 273–84.
- Head, J.A., Dolinoy, D.C., Basu, N., 2012. Epigenetics for ecotoxicologists. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 221–7.
- Hecker, M., Hollert, H., 2009. Effect-directed analysis (EDA) in aquatic ecotoxicology: state of the art and future challenges. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 16, 607–13.
- Heininger, K., 2002. Aging is a deprivation syndrome driven by a germ-soma conflict. *Ageing Res. Rev.* 1, 481–536.
- Helbing, C.C., Ovaska, K., Ji, L., 2006. Evaluation of the effect of acetochlor on thyroid hormone receptor gene expression in the brain and behavior of *Rana catesbeiana* tadpoles. *Aquat. Toxicol.* 80, 42–51.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals, in: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 319–368.
- Heu, C., Elie-Caille, C., Mougey, V., Launay, S., Nicod, L., 2012. A step further toward glyphosate-induced epidermal cell death: involvement of mitochondrial and oxidative mechanisms. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 34, 144–53.

- Huang, L., Wang, C., Zhang, Y., Wu, M., Zuo, Z., 2013. Phenanthrene causes ocular developmental toxicity in zebrafish embryos and the possible mechanisms involved. *J. Hazard. Mater.* 261, 172–80.
- Huang, Z., Chen, Y., Zhao, Y., Zuo, Z., Chen, M., Wang, C., 2005. Antioxidant responses in *Meretrix meretrix* exposed to environmentally relevant doses of tributyltin. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20, 107–11.
- Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., Pickford, D.B., 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: a critical review. *Aquat. Toxicol.* 76, 69–92.
- Huvet, A., Normand, J., Fleury, E., Quillien, V., Fabioux, C., Boudry, P., 2010. Reproductive effort of Pacific oysters: A trait associated with susceptibility to summer mortality. *Aquaculture* 304, 95–99.
- Ifremer, 2010. Qualité du Milieu Marin Littoral Bulletin de la surveillance - Edition 2010 (Gironde, Landes, Pyrénées Atlantiques). Arcachon.
- Ifremer, 2012. Les surmortalités des naissains d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* - journée d'information et d'échanges du 18 janvier 2012.
- Ifremer, LPTC, 2008. Impact potentiel des activités nautiques sur la qualité des eaux du Bassin d'Arcachon. Bordeaux.
- Inaba, S., Takenaka, C., 2005. Effects of dissolved organic matter on toxicity and bioavailability of copper for lettuce sprouts. *Environ. Int.* 31, 603–8.
- Invasive Species Specialist Group, 2005. Global Invasive Species Database [WWW Document]. URL <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=797&fr=1&sts=sss&lang=EN> (accessed 12.5.13).
- Jeong, W.-G., Cho, S.-M., 2007. Long-term effect of polycyclic aromatic hydrocarbon on physiological metabolisms of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 265, 343–350.
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207–21.
- Jo, P.G., Choi, Y.K., Choi, C.Y., 2008. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 147, 460–9.
- Joly, P., Bonnemoy, F., Charvy, J.-C., Bohatier, J., Mallet, C., 2013. Toxicity assessment of the maize herbicides S-metolachlor, benoxacor, mesotrione and nicosulfuron, and their corresponding commercial formulations, alone and in mixtures, using the Microtox® test. *Chemosphere* 93, 2444–50.
- Jørgensen, A., Giessing, A.M.B., Rasmussen, L.J., Andersen, O., 2008. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine polychaetes. *Mar. Environ. Res.* 65, 171–86.
- Jouaux, A., Heude-Berthelin, C., Sourdain, P., Mathieu, M., Kellner, K., 2010. Gametogenic stages in triploid oysters *Crassostrea gigas*: Irregular locking of gonial proliferation and subsequent reproductive effort. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 395, 162–170.
- Katagi, T., 2010. Review of Environmental Contamination and Toxicology - Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York, New York, NY.

- Kehrer, J.P., 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149, 43–50.
- Kiaune, L., Singhasemanon, N., 2011. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 213, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Springer New York, New York, NY.
- Kim, A., Park, M., Yoon, T.K., Lee, W.S., Ko, J.-J., Lee, K., Bae, J., 2011. Maternal exposure to benzo[b]fluoranthene disturbs reproductive performance in male offspring mice. *Toxicol. Lett.* 203, 54–61.
- Kim, K.-H., Jahan, S.A., Kabir, E., Brown, R.J.C., 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ. Int.* 60C, 71–80.
- Knuckles, M.E., Inyang, F., Ramesh, A., 2004. Acute and subchronic oral toxicity of fluoranthene in F-344 rats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 102–8.
- Konstantinou, I.K., Albanis, T.A., 2004. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environ. Int.* 30, 235–48.
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N., Andreyev, A., 2002. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)+oxidation–reduction state. *Biochem. J.* 368, 545–553.
- Labib, S., Guo, C.H., Williams, A., Yauk, C.L., White, P.A., Halappanavar, S., 2013. Toxicogenomic outcomes predictive of forestomach carcinogenesis following exposure to benzo(a)pyrene: Relevance to human cancer risk. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*
- Lallias, D., Arzul, I., Heurtebise, S., Ferrand, S., Chollet, B., Robert, M., Beaumont, A.R., Boudry, P., Morga, B., Lapègue, S., 2008. Bonamia ostreae-induced mortalities in one-year old European flat oysters *Ostrea edulis*: experimental infection by cohabitation challenge. *Aquat. Living Resour.* 21, 423–439.
- Laskowski, R., Bednarska, A.J., Kramarz, P.E., Loureiro, S., Scheil, V., Kudłek, J., Holmstrup, M., 2010. Interactions between toxic chemicals and natural environmental factors: a meta-analysis and case studies. *Sci. Tot. Env.* 408, 3763–74.
- Lasserre, P., 1979. Coastal lagoons - Sanctuary ecosystems, cradles of culture, target for economic growth. *Nat. ressources* 15, 2–21.
- Lazartigues, A., Thomas, M., Grandclaude, C., Brun-Bellut, J., Feidt, C., 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons and hydroxylated metabolites in the muscle tissue of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) through dietary exposure during a 56-day period. *Chemosphere* 84, 1489–94.
- Le Berre, S., Courtel, J., Brigand, L., 2010. Etude de la fréquentation nautique du Bassin d'Arcachon. Plouzané.
- León, V.M., Moreno-González, R., González, E., Martínez, F., García, V., Campillo, J. a, 2013. Interspecific comparison of polycyclic aromatic hydrocarbons and persistent organochlorines bioaccumulation in bivalves from a Mediterranean coastal lagoon. *Sci. Tot. Env.* 463-464C, 975–987.
- Levine, J.F., Law, M., Corsin, F., 2012. Bivalves, in: Lewbart, G.A. (Ed.), *Invertebrate Medicine*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 127–151.
- Li, Q., Zhao, X., Kong, L., Yu, H., 2013. Transcriptomic response to stress in marine bivalves. *Invertebr. Surviv. J.* 10, 84–93.

- Li, W., Zha, J., Li, Z., Yang, L., Wang, Z., 2009. Effects of exposure to acetochlor on the expression of thyroid hormone related genes in larval and adult rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Aquat. Toxicol.* 94, 87–93.
- Li, Y., Qin, J.G., Abbott, C.A., Li, X., Benkendorff, K., 2007. Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of *Crassostrea gigas*: an explanation for summer mortality in Pacific oysters. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, 2353–2362.
- Li, Y., Qin, J.G., Li, X., Benkendorff, K., 2009a. Spawning-dependent stress responses in pacific oysters *Crassostrea gigas*: A simulated bacterial challenge in oysters. *Aquaculture* 293, 164–171.
- Li, Y., Qin, J.G., Li, X., Benkendorff, K., 2009b. Spawning-dependent stress response to food deprivation in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 286, 309–317.
- Liang, B., Wang, L., He, T., Liu, W., Li, Q., Li, M., 2013. *In vitro* reactive oxygen species production by mitochondria from the rabbitfish *Siganus fuscus* livers and the effects of Irgarol-1051. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 35, 154–60.
- Liu, H., Ye, W., Zhan, X., Liu, W., 2006. A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 451–5.
- Liu, Y., Zhang, Y., Liu, J., Huang, D., 2006. The role of reactive oxygen species in the herbicide acetochlor-induced DNA damage on *Bufo raddei* tadpole liver. *Aquat. Toxicol.* 78, 21–6.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–8.
- Lucas, A., Beninger, P.G., 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture* 44, 187–200.
- Luo, X.-J., Chen, S.-J., Mai, B.-X., Yang, Q.-S., Sheng, G.-Y., Fu, J.-M., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons in suspended particulate matter and sediments from the Pearl River Estuary and adjacent coastal areas, China. *Environ. Pollut.* 139, 9–20.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30.
- Macintyp, H.L., Miller, D.C., 1996. Microphytobenthos : The Ecological Role of the “Secret Garden” of Unvegetated , Shallow-Water Marine Habitats . I . Distribution , Abundance and Primary Production. *Estuaries* 19, 186–201.
- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H., Morin, B., 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2663–70.
- Mai, H., Morin, B., Pardon, P., Gonzalez, P., Budzinski, H., Cachot, J., 2013. Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 89, 1–8.
- Mao, H., Wang, D.-H., Yang, W.-X., 2012. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquat. Toxicol.* 110-111, 208–13.
- Margoshes, M., Vallee, B.L., 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813–4814.

- Maria, V.L., Gomes, T., Barreira, L., Bebianno, M.J., 2013. Impact of Benzo(a)pyrene, Cu and their mixture on the proteomic response of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*
- Marie, V., 2005. Etude de la réponse des métallothionéines chez les bivalves, *Corbicula fluminea*, *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea gigas*, après exposition au cadmium et au zinc - Approches *in situ* et expérimentales -. Thèse Dr. l'université Bordeaux 1. 461 p.
- Marie, V., Baudrimont, M., Boudou, A., 2006a. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65, 609–17.
- Marie, V., Gonzalez, P., Baudrimont, M., Boutet, I., Moraga, D., Bourdineaud, J.-P., Boudou, A., 2006b. Metallothionein gene expression and protein levels in triploid and diploid oysters *Crassostrea gigas* after exposure to cadmium and zinc. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 412–8.
- Martins, M., Costa, P.M., Ferreira, A.M., Costa, M.H., 2013. Comparative DNA damage and oxidative effects of carcinogenic and non-carcinogenic sediment-bound PAHs in the gills of a bivalve. *Aquat. Toxicol.* 142-143, 85–95.
- Mason, R.P., 2013. Trace metals and organisms: Essential and toxic metals, organometallics, microbial processes, and metal bioaccumulation, in: Mason, R.P. (Ed.), *Trace Metals in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 370–421.
- Mat, A.M., Haberkorn, H., Bourdineaud, J.-P., Massabuau, J.-C., Tran, D., 2013. Genetic and genotoxic impacts in the oyster *Crassostrea gigas* exposed to the harmful alga *Alexandrium minutum*. *Aquat. Toxicol.* 140-141, 458–65.
- Maurer, D., Auby, I., Barbier, C., Schirr Bonnans, I., Tournaire, M.-P., Rumebe, M., Cantin, C., Gilles, T., 2009. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon - année 2009. Arcachon.
- Maurer, D., Auby, I., Moran, A., Barbier, C., Perrière-rumèbe, M., Tournaire, M.-P., Isabelle, A., Connes, C., 2011. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon - Année 2011. Ifremer (LER AR). 61.
- Maurer, D., Comps, M., 1986. Summer mortality of oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Arcachon: environmental biochemical and histological aspects. *Eur. Aquac. Soc.*
- McElroy, A.E., Barron, M.G., Beckvar, N., Driscoll, S.B.K., Meador, J.P., Parkerton, T.F., Preuss, T.G., Stevens, J. a, 2011. A review of the tissue residue approach for organic and organometallic compounds in aquatic organisms. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 50–74.
- McGinnis, C.L., Crivello, J.F., 2011. Elucidating the mechanism of action of tributyltin (TBT) in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 103, 25–31.
- Mee, L., 2012. Between the Devil and the Deep Blue Sea: The coastal zone in an Era of globalisation. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 96, 1–8.
- Meistertzheim, A.-L., Lejart, M., Le Goïc, N., Thébault, M.-T., 2009. Sex-, gametogenesis, and tidal height-related differences in levels of HSP70 and metallothioneins in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 152, 234–9.
- Meistertzheim, A.-L., Tanguy, A., Moraga, D., Thébault, M.-T., 2007. Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress. *FEBS J.* 274, 6392–402.

- Meresse, M., Frostin, G., 2012. Quel avenir pour la filière ostréicole dans les régions de la façade atlantique française ?
- Michel, C., Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Palais, F., Geffard, A., Vincent-Hubert, F., 2013. Seasonal and PAH impact on DNA strand-break levels in gills of transplanted zebra mussels. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 92, 18–26.
- Minier, C., Lelong, C., Djemel, N., Rodet, F., Tutundjian, R., Favrel, P., Mathieu, M., Leboulenger, F., 2002. Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 54, 455–9.
- Miossec, L., Le Deuf, R.-M., Gouletquer, P., 2009. Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster).
- Monari, M., Cattani, O., Serrazanetti, G.P., Selli, A., Pagliuca, G., Zironi, E., O'Hara, S.C.M., Livingstone, D.R., 2007. Effect of exposure to benzo[a]pyrene on SODs, CYP1A1/1A2- and CYP2E1 immunopositive proteins in the blood clam *Scapharca inaequivalvis*. *Mar. Environ. Res.* 63, 200–18.
- Monserrat, J.M., Letts, R.E., Ferreira, J.L.R., Ventura-lima, J., Amado, L., Rocha, A.M., Gorbi, S., Bocchetti, R., Benedetti, M., Regoli, F., 2012. Biomarkers of Oxidative Stress : Benefits and Drawbacks for their Application in Biomonitoring of aquatic environments, in: Abele, D., Vázquez-Medina, J.P., Zenteno-Savin, T. (Eds.), *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. Blackwell Publishing Ltd., pp. 317–326.
- Monserrat, J.M., Martínez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G.L.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 146, 221–34.
- Moraga, D., Meistertzheim, A.-L., Tanguy-Royer, S., Boutet, I., Tanguy, A., Donval, A., 2005. Stress response in Cu²⁺ and Cd²⁺ exposed oysters (*Crassostrea gigas*): an immunohistochemical approach. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 141, 151–6.
- Morin, B., Filatreau, J., Vicquelin, L., Barjhoux, I., Guinel, S., Leray-Forget, J., Cachot, J., 2011. Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2235–42.
- Mosleh, Y.Y., Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., 2006. Metallothioneins induction and antioxidative response in aquatic worms *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) exposed to copper. *Chemosphere* 64, 121–8.
- Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2013. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268, 157–77.
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpentine, A., Lebel, J.M., Jha, A.N., Costil, K., 2013. Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 128-129, 67–78.
- Mottin, E., Caplat, C., Latire, T., Mottier, A., Mahaut, M.-L., Costil, K., Barillier, D., Lebel, J.-M., Serpentine, A., 2012. Effect of zinc sacrificial anode degradation on the defence system of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: chronic and acute exposures. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 1911–20.
- Muller, F.L.L., Gulin, S.B., Kalvøy, Å., 2001. Chemical speciation of copper and zinc in surface waters of the western Black Sea. *Mar. Chem.* 76, 233–251.

- Munkittrick, K.R., McCarty, L.S., 1995. An integrated approach to aquatic ecosystem health: top-down, bottom-up or middle-out? *J. Aquat. Ecosyst. Heal.* 4, 77–90.
- Narbonne, J.F., Djomo, J.E., Ribera, D., Ferrier, V., Garrigues, P., 1999. Accumulation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed to sediment by the mollusk *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42, 1–8.
- Neff, J.M., Stout, S.A., Gunster, D.G., 2005. Ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments: identifying sources and ecological hazard. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 1, 22–33.
- Nell, J. a, 2002. Farming triploid oysters. *Aquaculture* 210, 69–88.
- Nesci, S., Ventrella, V., Trombetti, F., Pirini, M., Pagliarani, A., 2011. Tributyltin (TBT) and mitochondrial respiration in mussel digestive gland. *Tox. In Vitro* 25, 951–959.
- Nevitt, T., Ohrvik, H., Thiele, D.J., 2012. Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 1580–93.
- Newton, A., Icely, J., Cristina, S., Brito, A., Cardoso, A.C., Colijn, F., Riva, S.D., Gertz, F., Hansen, J.W., Holmer, M., Ivanova, K., Leppäkoski, E., Canu, D.M., Mocenni, C., Mudge, S., Murray, N., Pejrup, M., Razinkovas, A., Reizopoulou, S., Pérez-Ruzafa, A., Schernewski, G., Schubert, H., Carr, L., Solidoro, C., Zaldívar, J.-M., 2013. An overview of ecological status, vulnerability and future perspectives of European large shallow, semi-enclosed coastal systems, lagoons and transitional waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*
- Ng, T.Y.-T., Rainbow, P.S., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Wang, W.-X., 2007. Metallothionein turnover, cytosolic distribution and the uptake of Cd by the green mussel *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.* 84, 153–61.
- Nikinmaa, M., Rytönen, K.T., 2011. Functional genomics in aquatic toxicology-do not forget the function. *Aquat. Toxicol.* 105, 16–24.
- Nikinmaa, M., Rytönen, K.T., 2012. From genomes to functions in aquatic biology. *Mar. Genomics* 5, 1–6.
- Nikoloff, N., Escobar, L., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2013. Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects induced by herbicide S-metolachlor and its commercial formulation twin pack gold(®) in human hepatoma (HepG2) cells. *Food Chem. Toxicol.* 62C, 777–781.
- Nimmo, D.R., McEwen, L., 1997. Pesticides, in: Calow, P. (Ed.), *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, pp. 619–667.
- Normand, J., Le Pennec, M., Boudry, P., 2008. Comparative histological study of gametogenesis in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. *Aquaculture* 282, 124–129.
- Olive, P.L., Banath, J.P., 1995. Sizing Highly Fragmented DNA in Individual Apoptotic Cells Using the Comet Assay and a DNA Crosslinking Agent. *Exp. Cell Res.* 221, 19–26.
- Páez-Osuna, F., Frías-Espericueta, M.G., Osuna-López, J.I., 1995. Trace metal concentrations in relation to season and gonadal maturation in the oyster *Crassostrea iridescens*. *Mar. Environ. Res.* 40, 19–31.
- Pagliarani, A., Nesci, S., Ventrella, V., 2013. Toxicity of organotin compounds: Shared and unshared biochemical targets and mechanisms in animal cells. *Tox. In Vitro*.

- Pain, S., Parant, M., 2003. Le mécanisme de défense multixénobiotique (MDMX) chez les bivalves. *C. R. Biol.* 326, 659–672.
- Paquin, P.R., Gorsuch, J.W., Apte, S., Batley, G.E., Bowles, K.C., Campbell, P.G.C., Delos, C.G., Di Toro, D.M., Dwyer, R.L., Galvez, F., Gensemer, R.W., Goss, G.G., Hostrand, C., Janssen, C.R., McGeer, J.C., Naddy, R.B., Playle, R.C., Santore, R.C., Schneider, U., Stubblefield, W.A., Wood, C.M., Wu, K.B., 2002. The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 133, 3–35.
- Park, K., Kim, R., Park, J.J., Shin, H.C., Lee, J.S., Cho, H.S., Lee, Y.G., Kim, J., Kwak, I.-S., 2012. Ecotoxicological evaluation of tributyltin toxicity to the equilateral venus clam, *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae). *Fish Shellfish Immunol.* 32, 426–433.
- Park, M.S., Jo, P.G., Choi, Y.K., An, K.W., Choi, C.Y., 2009. Characterization and mRNA expression of Mn-SOD and physiological responses to stresses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol. Res.* 5, 451–461.
- Park, S.-G., Cui, S., Jo, S.-C., Nam, S., Lee, Y.-I., 2007. Structural characterization ofalachlor complexes with transition metal ions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Microchem. J.* 86, 248–256.
- Parlement européen et Conseil de l'Union Européenne, 2003. Règlement (CE) n° 782/2003 du Parlement européen et du Conseil du 14 avril 2003 interdisant les composés organostanniques sur les navires. *J. Off. l'Union Eur.* du 09.05.2003 (JO L 115/1). 11 p.
- Parlement européen et Conseil de l'Union Européenne, 2008. Directive 2008/105/CE du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant et abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/. *J. Off. des Communautés Eur.* du 24.12.2008 (JO L 348/84). 14 p.
- Patrolecco, L., Ademollo, N., Capri, S., Pagnotta, R., Polesello, S., 2010. Occurrence of priority hazardous PAHs in water, suspended particulate matter, sediment and common eels (*Anguilla anguilla*) in the urban stretch of the River Tiber (Italy). *Chemosphere* 81, 1386–92.
- Paule, A., Roubex, V., Lauga, B., Duran, R., Delmas, F., Paul, E., Rols, J.L., 2013. Changes in tolerance to herbicide toxicity throughout development stages of phototrophic biofilms. *Aquat. Toxicol.* Accepted, 40 p.
- Peixoto, F., 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere* 61, 1115–22.
- Perrière-Rumèbe, M., 2012. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon Année 2012. Ifremer (LER AR). 63 p.
- Pesce, S., Fajon, C., Bardot, C., Bonnemoy, F., Portelli, C., Bohatier, J., 2006. Effects of the phenylurea herbicide diuron on natural riverine microbial communities in an experimental study. *Aquat. Toxicol.* 78, 303–14.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Bossy, A., Bourdineaud, J.-P., Brèthes, D., Elie, P., Massabuau, J.-C., 2007. Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquat. Toxicol.* 81, 304–11.
- Plus, M., Dalloyau, S., Trut, G., Auby, I., De Montaudouin, X., Emery, É., Claire, N., Christophe, V., 2010. Long-term evolution (1988–2008) of *Zostera spp.* meadows in Arcachon Bay (Bay of Biscay). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 87, 357–366.

- Plus, M., Dumas, F., Stanisière, J.-Y., Maurer, D., 2009. Hydrodynamic characterization of the Arcachon Bay, using model-derived descriptors. *Cont. Shelf Res.* 29, 1008–1013.
- Pouvreau, S., Bernard, I., Le Souchu, P., Queau, I., Talarmain, E., Auby, I., Maurer, D., Barbier, C., Tournaire, M.P., Fleury, E., Claude, S., Langlade, A., Collin, K., Fortune, M., Hitier, B., Robert, S., Guilpain, P., Grizon, J., Guesdon, S., Quemener, L., Repecaud, M., Barbot, S., Guillemot, A., Nonnotte, L., Duros, W., Bonnat, A., Tarot, S., Mille, D., Geay, A., 2012. Observer, Analyser et Gérer la variabilité de la reproduction et du recrutement de l'huître creuse en France : Le Réseau Velyger - Rapport annuel 2011.
- Powell, E.N., Bochenek, E.A., Klinck, J.M., Hofmann, E.E., 2002. Influence of food quality and quantity on the growth and development of *Crassostrea gigas* larvae: a modeling approach. *Aquaculture* 210, 89–117.
- Puckett, C.A., Ernst, R.J., Barton, J.K., 2010. Exploring the cellular accumulation of metal complexes. *Dalton Trans.* 39, 1159–70.
- Puig, S., Thiele, D.J., 2002. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 171–80.
- Radwan, M.A., Mohamed, M.S., 2013. Imidacloprid induced alterations in enzyme activities and energy reserves of the land snail, *Helix aspersa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 95, 91–7.
- Regoli, F., 2012. Chemical Pollutants and the Mechanisms of Reactive Oxygen Species Generation in Aquatic Organisms, in: Abele, D., Vàsquez-Medina, J.P., Zenteno-Savin, T. (Eds.), *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. Blackwell Publishing Ltd., pp. 308–316.
- Regoli, F., Giuliani, M.E., 2013. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.*
- Rewitz, K.F., Styrihave, B., Løbner-Olsen, A., Andersen, O., 2006. Marine invertebrate cytochrome P450: emerging insights from vertebrate and insects analogies. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 143, 363–81.
- Rico-Villa, B., Pouvreau, S., Robert, R., 2009. Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 287, 395–401.
- Ringwood, A.H., Connors, D.E., Di Novo, A., 1998. The effects of copper exposures on cellular responses in oysters. *Mar. Environ. Res.* 46, 591–595.
- Rocher, B., Le Goff, J., Peluhet, L., Briand, M., Manduzio, H., Gallois, J., Devier, M.H., Geffard, O., Gricourt, L., Augagneur, S., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Lebailly, P., Cachot, J., 2006. Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquat. Toxicol.* 79, 65–77.
- Rodrigues, A.P., Lehtonen, K.K., Guilhermino, L., Guimarães, L., 2013. Exposure of *Carcinus maenas* to waterborne fluoranthene: accumulation and multibiomarker responses. *Sci. Tot. Env.* 443, 454–63.
- Roesijadi, G., Hanse, K.M., Unger, M.E., 1997. Metallothionein mRNA accumulation in early developmental stages of *Crassostrea virginica* following pre-exposure and challenge with cadmium. *Aquat. Toxicol.* 39, 185–194.
- Roesijadi, G., Rezvankhah, S., Perez-Matus, A., Mittelberg, A., Torruellas, K., Van Veld, P.A., 2009. Dietary cadmium and benzo(a)pyrene increased intestinal metallothionein expression in the fish *Fundulus heteroclitus*. *Mar. Environ. Res.* 67, 25–30.

- Rollin, C., Quiot, F., 2006. Eléments traces métalliques - guide méthodologique : recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. Rapp. d'étude INERIS. 138 p.
- Romero-Isart, N., Vasák, M., 2002. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J. Inorg. Biochem.* 88, 388–96.
- Royer, J., Ropert, M., Costil, K., 2007. Spatio-temporal changes in mortality, growth and condition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Normandy (France). *J. Shellfish Res.* 26, 973–984.
- Rüdel, H., 2003. Case study: bioavailability of tin and tin compounds. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 180–189.
- Ruttikay-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R., 2013. The role of metallothionein in oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6044–66.
- Salem, M., Silverstein, J., Rexroad, C.E., Yao, J., 2007. Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics* 8, 328.
- Salgueiro, M., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M.I., Caro, R., De Paoli, T., Hager, A., 2000. Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutr. Res.* 20, 737–755.
- Salvo, F., 2010. Approche comparée des populations naturelles et cultivées d'huître japonaise *Crassostrea gigas* dans une lagune macro-tidale (Bassin d'Arcachon) : cycle biologique, relations trophiques et effets sur le benthos. Thèse Dr. l'université Bordeaux I. 510 p.
- Samain, J.-F., 2011. Review and perspectives of physiological mechanisms underlying genetically-based resistance of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to summer mortality. *Aquat. Living Resour.* 24, 227–236.
- Samain, J.F., Dégremont, L., Soletchnik, P., Haure, J., Bédier, E., Ropert, M., Moal, J., Huvet, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, C., Boulo, V., Soudant, P., Nicolas, J.L., Le Roux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Geret, F., Boutet, I., Burgeot, T., Boudry, P., 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 268, 227–243.
- Schmidt, W., Power, E., Quinn, B., 2013. Seasonal variations of biomarker responses in the marine blue mussel (*Mytilus spp.*). *Mar. Pollut. Bull.* In Press.
- Schmitt-Jansen, M., Veit, U., Dudel, G., Altenburger, R., 2008. An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: Approaches and challenges. *Basic Appl. Ecol.* 9, 337–345.
- Schuette, J., 1998. Environmental fate of glyphosate. *Environ. Monit. Pest Manag. - Dep. Pestic. Regul.* Sacramento, 13 p.
- Sekar, R., Kailasa, S.K., Abdelhamid, H.N., Chen, Y.-C., Wu, H.-F., 2013. Electrospray ionization tandem mass spectrometric studies of copper and iron complexes with tobramycin. *Int. J. Mass Spectrom.* 338, 23–29.
- Sericano, J.L., Wade, T.L., Brooks, J.M., 1996. Accumulation and depuration of organic contaminants by the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Sci. Tot. Env.* 179, 149–160.
- Service des statistiques et de l'information du Département des pêches et de l'aquaculture, 2012. FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture. 2010, FAO. ed. FAO, Rome.

- Shahidul, M., Tanaka, M., 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 624–49.
- Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123, 193–9.
- Shen, H., Huang, Y., Wang, R., Zhu, D., Li, W., Shen, G., Wang, B., Zhang, Y., Chen, Y., Lu, Y., Chen, H., Li, T., Sun, K., Li, B., Liu, W., Liu, J., Tao, S., 2013. Global atmospheric emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from 1960 to 2008 and future predictions. *Environ. Sci. Technol.* 47, 6415–24.
- Snape, J.R., Maund, S.J., Pickford, D.B., Hutchinson, T.H., 2004. Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquat. Toxicol.* 67, 143–54.
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79, 1–15.
- Soletchnik, P., Ropert, M., Mazurié, J., Gildas Fleury, P., Le Coz, F., 2007. Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. *Aquaculture* 271, 384–400.
- Srinivasan, S., Avadhani, N.G., 2012. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 1252–63.
- Steinberg, C.E.W., Stürzenbaum, S.R., Menzel, R., 2008. Genes and environment - striking the fine balance between sophisticated biomonitoring and true functional environmental genomics. *Sci. Tot. Env.* 400, 142–61.
- Strady, E., Schäfer, J., Baudrimont, M., Blanc, G., 2011. Tracing cadmium contamination kinetics and pathways in oysters (*Crassostrea gigas*) by multiple stable Cd isotope spike experiments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 600–606.
- Sureda, A., Tejada, S., Box, A., Deudero, S., 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbon levels and measures of oxidative stress in the Mediterranean endemic bivalve *Pinna nobilis* exposed to the Don Pedro oil spill. *Mar. Pollut. Bull.* 71, 69–73.
- Sussarellu, R., Fabioux, C., Le Moullac, G., Fleury, E., Moraga, D., 2010. Transcriptomic response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia. *Mar. Genomics* 3, 133–143.
- Suzuki, J.S., Ishido, M., 2011. Transcriptome of tributyltin-induced apoptosis of the cultured rat mesencephalic neural stem cells. *Toxicology* 287, 61–8.
- Suzuki, T., Nojiri, H., Isono, H., Ochi, T., 2004. Oxidative damages in isolated rat hepatocytes treated with the organochlorine fungicides captan, dichlofluanid and chlorothalonil. *Toxicology* 204, 97–107.
- Sze, P.W.C., Lee, S.Y., 1995. The Potential Role of Mucus in the Depuration of Copper from the Mussels *Perna viridis* (L.) and *Septifer virgatus* (Wiegmann). *Mar. Pollut. Bull.* 31, 390–393.
- Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J., Moraga, D., 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *FEBS J.* 272, 390–403.

- Tanguy, A., Fernandez Castro, N., Marhic, A., Moraga, D., Fernandez Castroà, N., 1999. Effects of an Organic Pollutant (Tributyltin) on Genetic Structure in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Pollut. Bull. 38, 550–559.
- Tanguy, A., Moraga, D., 2001. Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metal-induced stress ? Gene 273, 123–130.
- Tanguy, A., Mura, C., Moraga, D., 2001. Cloning of a metallothionein gene and characterization of two other cDNA sequences in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT1). Aquat. Toxicol. 55, 35–47.
- Tao, S., Wen, Y., Long, A., Dawson, R., Cao, J., Xu, F., 2001. Simulation of acid-base condition and copper speciation in the fish gill microenvironment. Comput. Chem. 25, 215–22.
- Tapie, N., Le Menach, K., Pasquaud, S., Elie, P., Devier, M.-H., Budzinski, H., 2011. PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: from glass eels to silver eels. Chemosphere 83, 175–85.
- Terlizzi, A., Fraschetti, S., Gianguzza, P., Faimali, M., Boero, F., 2001. Environmental impact of antifouling technologies: state of the art and perspectives. Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst. 11, 311–317.
- Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., Satayavivad, J., 2013. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. Food Chem. Toxicol. 59C, 129–136.
- Tobiszewski, M., Namieśnik, J., 2012. PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. Environ. Pollut. 162, 110–9.
- Toor, H.K., Sangha, G.K., Khera, K.S., 2013. Imidacloprid induced histological and biochemical alterations in liver of female albino rats. Pestic. Biochem. Physiol. 105, 1–4.
- Tortajada, S., Niquil, N., Blanchet, H., Grami, B., Montanié, H., David, V., Glé, C., Saint-Béat, B., Johnson, G. a., Marquis, E., Del Amo, Y., Dubois, S., Vincent, D., Dupuy, C., Jude, F., Hartmann, H.J., Sautour, B., 2012. Network analysis of the planktonic food web during the spring bloom in a semi enclosed lagoon (Arcachon, SW France). Acta Oecologica 40, 40–50.
- Toxem, 2012. Suivi de l'imposex sur le littoral français de la Manche et de l'Atlantique en 2012 - avec intégration des données 2010 et 2011.
- Trinelli, M.A., Areco, M.M., Afonso, M.D.S., 2013. Co-biosorption of copper and glyphosate by *Ulva lactuca*. Colloids Surf. B. Biointerfaces 105, 251–258.
- Trisciani, A., Corsi, I., Torre, C. Della, Perra, G., Focardi, S., 2011. Hepatic biotransformation genes and enzymes and PAH metabolites in bile of common sole (*Solea solea*, Linnaeus, 1758) from an oil-contaminated site in the Mediterranean Sea: a field study. Mar. Pollut. Bull. 62, 806–14.
- Troost, K., 2010. Causes and effects of a highly successful marine invasion: Case-study of the introduced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in continental NW European estuaries. J. Sea Res. 64, 145–165.
- Unger, M.E., Roesijadi, G., 1996. Increase in metallothionein mRNA accumulation during Cd challenge in oysters preexposed to Cd. Aquat. Toxicol. 34, 185–193.

- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–89.
- Van Aggelen, G., Ankley, G.T., Baldwin, W.S., Bearden, D.W., Benson, W.H., Chipman, J.K., Collette, T.W., Craft, J.A., Denslow, N.D., Embry, M.R., Falciani, F., George, S.G., Helbing, C.C., Hoekstra, P.F., Iguchi, T., Kagami, Y., Katsiadaki, I., Kille, P., Liu, L., Lord, P.G., McIntyre, T., O'Neill, A., Osachoff, H., Perkins, E.J., Santos, E.M., Skirrow, R.C., Snape, J.R., Tyler, C.R., Versteeg, D., Viant, M.R., Volz, D.C., Williams, T.D., Yu, L., 2010. Integrating omic technologies into aquatic ecological risk assessment and environmental monitoring: hurdles, achievements, and future outlook. *Environ. Health Perspect.* 118, 1–5.
- Vandeghechte, M.B., Janssen, C.R., 2011. Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20, 607–24.
- Vandeghechte, M.B., Janssen, C.R., 2013. Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutat. Res.*
- Vasák, M., 2005. Advances in metallothionein structure and functions. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19, 13–7.
- Vasseur, P., Cossu-Leguille, C., 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environ. Int.* 28, 711–7.
- Veiga, F., Zapata, J.M., Fernandez Marcos, M.L., Alvarez, E., 2001. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *Sci. Tot. Env.* 271, 135–44.
- Viant, M.R., 2007. Metabolomics of aquatic organisms : the new “ omics ” on the block. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 332, 301–306.
- Viarengo, a, Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, a, 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 146, 281–300.
- Wang, J., Jiang, Y., Chen, S., Xia, X., Shi, K., Zhou, Y., Yu, Y., Yu, J., 2010. The different responses of glutathione-dependent detoxification pathway to fungicide chlorothalonil and carbendazim in tomato leaves. *Chemosphere* 79, 958–65.
- Wang, L., Liang, B., Li, L., Liu, W., 2013. Induction of HepG2 cell apoptosis by Irgarol 1051 through mitochondrial dysfunction and oxidative stresses. *Tox. In Vitro* 27, 1771–9.
- Wang, W.-X., Rainbow, P.S., 2010. Significance of metallothioneins in metal accumulation kinetics in marine animals. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 152, 1–8.
- Wang, X., Song, M., Wang, Y., Gao, C., Zhang, Q., Chu, X., Fang, H., Yu, Y., 2012. Response of soil bacterial community to repeated applications of carbendazim. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 75, 33–9.
- Watson, R.T., Rosswall, T., Steiner, A., Töpfer, K., Arico, S., Bridgewater, P., 2005. Ecosystems and human well-being: synthesis, in: Watson, R.T., Rosswall, T., Steiner, A., Töpfer, K., Arico, S., Bridgewater, P. (Eds.), *Millennium Ecosystem Assessment, Millenium Assessments*. World Resources Institute, Washington, DC, p. 155.
- Weisshaar, H., Böger, P., 1987. Primary effects of chloroacetamides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 28, 286–293.

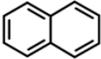
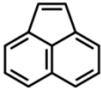
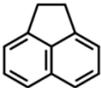
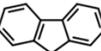
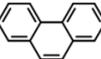
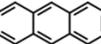
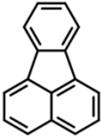
- Wessel, N., Ménard, D., Pichavant-Rafini, K., Ollivier, H., Le Goff, J., Burgeot, T., Akcha, F., 2012. Genotoxic and enzymatic effects of fluoranthene in microsomes and freshly isolated hepatocytes from sole (*Solea solea*). *Aquat. Toxicol.* 108, 33–41.
- Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., Akcha, F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17 α -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.* 85, 133–42.
- Wessel, N., Santos, R., Menard, D., Le Menach, K., Buchet, V., Lebayon, N., Loizeau, V., Burgeot, T., Budzinski, H., Akcha, F., 2010. Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). *Mar. Environ. Res.* 69 Suppl, S71–3.
- Whitehorn, P.R., O'Connor, S., Wackers, F.L., Goulson, D., 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* 336, 351–2.
- WHO, FAO, 2003. Joint FAO/WHO expert committee on food additives. Sixty-first meeting. Summary and conclusions. Rome.
- Wikström, M., 2010. Cytochrome c Oxidase, in: *Encyclopedia of Life Science (ELS)*. Chichester, pp. 1–10.
- Wootton, E.C., Dyrzynda, E.A., Pipe, R.K., Ratcliffe, N.A., 2003. Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquat. Toxicol.* 65, 13–25.
- Wu, S., Xu, X., Zhao, S., Shen, F., Chen, J., 2013. Evaluation of phenanthrene toxicity on earthworm (*Eisenia fetida*): An ecotoxicoproteomics approach. *Chemosphere* 93, 963–71.
- Xiao, N., Jing, B., Ge, F., Liu, X., 2006. The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Eisenia fetida* under laboratory conditions. *Chemosphere* 62, 1366–73.
- Xu, D., Wen, Y., Wang, K., 2010. Effect of chiral differences of metolachlor and its (S)-isomer on their toxicity to earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1925–31.
- Xue, W., Warshawsky, D., 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 73–93.
- Yakan, S.D., Henkelmann, B., Schramm, K.-W., Okay, O.S., 2011. Bioaccumulation depuration kinetics and effects of benzo(a)anthracene on *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Pollut. Bull.* 63, 471–6.
- Yu, S., Wages, M.R., Cobb, G.P., Maul, J.D., 2013. Effects of chlorothalonil on development and growth of amphibian embryos and larvae. *Environ. Pollut.* 181, 329–34.
- Zanette, J., Goldstone, J. V, Bainy, A.C.D., Stegeman, J.J., 2010. Identification of CYP genes in *Mytilus* (mussel) and *Crassostrea* (oyster) species: first approach to the full complement of cytochrome P450 genes in bivalves. *Mar. Environ. Res.* 69 Suppl, S1–3.
- Zanette, J., Jenny, M.J., Goldstone, J. V, Parente, T., Woodin, B.R., Bainy, A.C.D., Stegeman, J.J., 2013. Identification and expression of multiple CYP1-like and CYP3-like genes in the bivalve mollusk *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 128-129, 101–12.
- Zezulka, S., Kummerová, M., Babula, P., Váňová, L., 2013. *Lemna minor* exposed to fluoranthene: growth, biochemical, physiological and histochemical changes. *Aquat. Toxicol.* 140-141, 37–47.

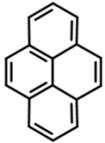
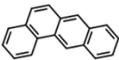
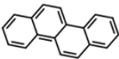
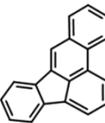
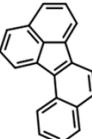
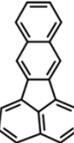
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54.
- Zhang, L.Z., Wei, N., Wu, Q.X., Ping, M.L., 2007. Anti-oxidant response of *Cucumis sativus L.* to fungicide carbendazim. *Pestic. Biochem. Physiol.* 89, 54–59.
- Zhang, Y., He, X., Yu, Z., 2011. Two homologues of inhibitor of NF-kappa B (I κ B) are involved in the immune defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 1354–61.
- Zhang, Y., Huang, L., Wang, C., Gao, D., Zuo, Z., 2013. Phenanthrene exposure produces cardiac defects during embryo development of zebrafish (*Danio rerio*) through activation of MMP-9. *Chemosphere* 93, 1168–75.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G., 2008. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Appl. Geochemistry* 606, 135–50.
- Zouaoui, K., Dulaurent, S., Gaulier, J.M., Moesch, C., Lachâtre, G., 2013. Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: about 13 cases of acute intoxication. *Forensic Sci. Int.* 226, e20–5.

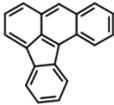
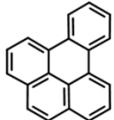
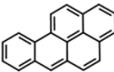
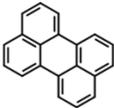
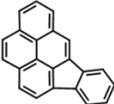
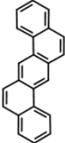
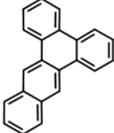
Annexes

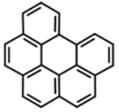
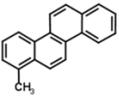
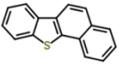
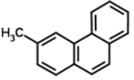
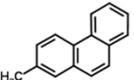
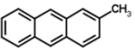
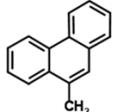
1.	STRUCTURE DES HAPS EXTRAITS ET ETALONS INTERNES CORRESPONDANTS	305
2.	DONNEES « HAPS » DU SUIVI <i>IN-SITU</i>	313
3.	DONNEES « CARBONE ORGANIQUE TOTAL » ET « TAUX LIPIDIQUES » DU SUIVI <i>IN-SITU</i>	321
4.	DONNEES « CROISSANCE » DU SUIVI <i>IN-SITU</i>	323
5.	DONNEES « METAUX » DU SUIVI <i>IN-SITU</i>	327
6.	DONNEES « MTS » DU SUIVI <i>IN-SITU</i>	337
7.	DONNEES « GENETIQUE » DU SUIVI <i>IN-SITU</i>	341
8.	DETAIL DES ACP REALISEES LORS DE L'APPROCHE <i>IN SITU</i>	347
9.	DONNEES DE L'EXPERIENCE <i>IN-SITU</i> « ETE 2012 »	361
10.	[MTS] DE L'EXPERIENCE EN LABORATOIRE « TBT »	371
11.	[Cu] ET [MTS] DE L'EXPERIENCE EN LABORATOIRE « PESTICIDES – CUIVRE »	373
12.	PUBLICATION: INVESTIGATING THE RESPONSE OF CUPROPROTEINS FROM OYSTER (<i>CRASSOSTREA GIGAS</i>) AFTER WATERBORNE COPPER EXPOSURE BY METALLOMIC AND PROTEOMIC APPROACHES	377

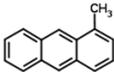
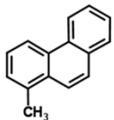
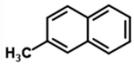
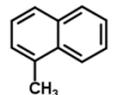
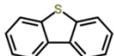
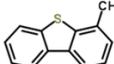
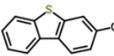
1. Structure des HAPs extraits et étalons internes correspondants

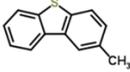
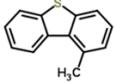
HAPs natifs (m/z)	Structure chimique (Chemspider)	Log K _{ow} (Crespo, 2009)	EI (m/z)	ES (m/z)	EI SPME (m/z)
Naphtalène (128)		3,4	Naphtalène d8 (136)	Pyrène d10 (212)	Naphtalène d8 (136)
Acénaphthylène (152)		4,07	Phénanthrène d10 (188)	Pyrène d10 (212)	Acénaphthylène d8 (160)
Acénaphène (154)		3,9	Phénanthrène d10 (188)	Pyrène d10 (212)	Acénaphène d8 (162)
Fluorène (166)		4,2	Phénanthrène d10 (188)	Pyrène d10 (212)	Fluorène d10 (176)
Phénanthrène (178)		4,6	Phénanthrène d10 (188)	Pyrène d10 (212)	Phénanthrène d10 (188)
Anthracène (178)		4,57	Anthracène d10 (188)	Pyrène d10 (212)	Anthracène d10 (188)
Fluoranthène (202)		5,22	Fluoranthène d10 (212)	Pyrène d10 (212)	Fluoranthène d10 (212)

Pyrène (202)		5,18	Fluoranthène d10 (212)	Pyrène d10 (212)	Pyrène d10 (212)
Benzo(a)anthracène (228)		5,61	Chrysène d12 (240)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)	Benzo(a)anthracène d12 (240)
Triphenylène (228)		5,45	Chrysène d12 (240)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)	Chrysène d12 (240)
Chrysène (228)		5,91	Chrysène d12 (240)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)	Chrysène d12 (240)
Benzo(b)fluoranthène (252)		6,12	Benzo(e)pyrène d12 (264)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)
Benzo(j)fluoranthène (252)		/	Benzo(e)pyrène d12 (264)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)
Benzo(k)fluoranthène (252)		6,84	Benzo(e)pyrène d12 (264)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)

Benzo(a)fluoranthène (252)		/	Benzo(e)pyrène d12 (264)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)	Benzo(k)fluoranthène d12 (264)
Benzo(e)pyrène (252)		6,44	Benzo(e)pyrène d12 (264)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)	Benzo(e)pyrène d12 (264)
Benzo(a)pyrène (252)		6,5	Benzo(a)pyrène d12 (264)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)	Benzo(a)pyrène d12 (264)
Pérylène (252)		5,3	Benzo(e)pyrène d12 (264)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)	Benzo(e)pyrène d12 (264)
Indéno(1,2,3_c,d)pyrène (276)		6,58	Benzo(g,h,i)pérylène d12 (288)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)	Indéno(1,2,3_c,d)pyrène d12 (288)
Dibenzo(ah)anthracène (278)		6,5	Benzo(g,h,i)pérylène d12 (288)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)	Dibenzo(ah)anthracène d14 (292)
Dibenzo(ac)anthracène (278)		/	Benzo(g,h,i)pérylène d12 (288)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)	Dibenzo(ah)anthracène d14 (292)

Benzo(g,h,i)pérylène (276)		7,1	Benzo(g,h,i)pérylène d12 (288)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)	Benzo(g,h,i)pérylène d12 (288)
Somme des méthyls chrysène (242)		/	Chrysène d12 (240)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)	/
Benzo(b)naphtho(2,1-d)thiophène (234)		/	Chrysène d12 (240)	Benzo(b)fluoranthène d12 (264)	Chrysène d12 (240)
3 Méthyl-phénanthrène (192)		/	Phénanthrène d10 (188)	Pyrène d10 (212)	/
2 Méthyl-phénanthrène (192)		/	Phénanthrène d10 (188)	Pyrène d10 (212)	/
2 Méthyl-anthracène (192)		/	Phénanthrène d10 (188)	Pyrène d10 (212)	/
9 Méthyl-phénanthrène (192)		/	Phénanthrène d10 (188)	Pyrène d10 (212)	/

1 Méthyl-anthracène (192)		/	Phénanthrène d10 (188)	Pyrène d10 (212)	/
1 Méthyl-phénanthrène		/	Phénanthrène d10 (188)	Pyrène d10 (212)	/
2 Méthyl-naphtalène (142)		/	Naphtalène d8 (136)	Pyrène d10 (212)	/
1 Méthyl-naphtalène (142)		/	Naphtalène d8 (136)	Pyrène d10 (212)	/
Dibenzothiophène (184)		4,49	Dibenzothiophène d8 (192)	Pyrène d10 (212)	/
4 Méthyl-dibenzothiophène (198)		/	Dibenzothiophène d8 (192)	Pyrène d10 (212)	/
3 Méthyl-dibenzothiophène (198)		/	Dibenzothiophène d8 (192)	Pyrène d10 (212)	/

2 Méthyl-dibenzothiophène (198)		/	Dibenzothiophène d8 (192)	Pyrène d10 (212)	/
1 Méthyl-dibenzothiophène (198)		/	Dibenzothiophène d8 (192)	Pyrène d10 (212)	/

2. Données « HAP » du suivi *in-situ*

Programme	Temps	Site	Naphth.	Acénaphth.	Fluo.	Dibenzo.	Phéna.	Anthra.	Fluoran.	Pyr.	2,1 d BNT	Ba(A)	Triph. + Chrys.	Bb(j,k)f	Ba(f)	Bc(f)	Ba(p)	Perylene	IP	D(ha,c)A	BP	D(a,p)	Cor	Somme 16 HAP	Somme totale	2 MN	1 MN	4 MDBT	3 + 2 MDBT	1 MDBT	3 MP	2 MP	2 MA	9 MP + 1 MA	1 MP	M Chrys	
																																					Mars 09
ASCOBAR année 2 - Huîtres cultivées (mg/g, ps)	Mars 09	Ar	2.3	8.6	0.2	0.5	0.5	4.2	0.8	21.0	24.9	1.9	6.4	12.1	31.2	2.6	9.9	5.9	1.3	6.3	3.1	4.0	130.3	158.2	1.2	1.4	0.5	0.3	0.5	1.2	1.8	0.5	1.6	1.5	12.8		
		Ar	1.5	0.4	0.0	1.2	0.1	3.9	0.9	10.3	5.5	0.6	2.6	7.3	11.7	1.1	5.2	1.5	1.8	2.2	0.4	2.9	1.2	2.9	52.4	65.4	0.5	0.6	nd	nd	nd	1.2	0.3	0.4	0.3	0.7	7.1
	Mai 09	qB	1.9	0.7	0.6	1.0	0.1	4.2	1.6	18.8	16.4	1.5	5.9	13.6	24.9	2.2	10.6	3.1	2.8	4.2	1.2	4.8	2.6	5.0	102.9	127.8	0.7	0.8	0.2	0.1	0.0	0.9	0.5	0.8	0.6	1.2	10.5
		qB	2.2	0.6	0.2	1.0	0.2	4.2	1.1	19.2	18.5	1.2	4.4	13.4	27.0	1.9	11.0	2.3	2.8	3.9	1.0	5.0	2.2	5.2	104.2	128.8	0.3	0.5	0.2	0.2	0.4	0.4	0.6	0.5	0.4	0.4	12.5
	Juillet 09	Io	0.8	1.6	0.6	1.4	0.2	5.9	2.0	37.1	38.1	3.7	13.2	28.0	61.3	3.0	24.7	9.3	5.1	11.4	2.7	11.2	6.1	8.1	224.6	275.5	0.2	0.6	0.3	0.3	0.4	1.5	1.2	0.6	0.9	1.2	20.2
		Lt	0.8	1.5	0.5	1.4	0.3	7.2	2.8	31.3	35.9	2.9	13.9	23.1	58.9	5.3	26.98	10.0	6.8	11.5	2.5	12.1	5.5	9.4	213.3	270.4	0.4	0.6	0.4	0.4	0.3	1.4	1.6	1.2	1.1	1.7	22.4
	Septembre 09	Ey	0.1	1.1	0.8	1.2	0.2	5.8	2.2	29.1	32.6	2.8	8.6	21.7	54.8	2.4	24.3	5.1	4.0	10.4	2.1	9.2	3.7	6.9	184.8	229.2	0.2	0.3	1.6	0.8	1.0	3.5	4.4	1.5	4.4	4.5	23.1
		Ar	1.3	0.4	0.3	1.1	0.4	4.5	0.6	10.2	5.9	0.9	2.8	6.3	29.5	3.8	32.4	2.2	2.0	2.5	0.7	2.7	nd	2.8	71.0	111.3	0.4	0.7	0.3	0.2	0.0	0.5	0.9	0.4	0.6	1.1	7.1
	Octobre 09	qB	3.0	2.5	0.5	3.3	0.7	12.1	4.7	48.7	41.0	4.6	20.1	35.1	88.5	24.4	42.9	9.2	8.2	10.6	2.7	10.6	4.7	6.8	292.6	384.9	2.2	2.4	0.8	0.8	0.8	3.5	5.2	1.6	3.6	4.7	28.2
		qB	1.7	0.6	0.2	1.8	0.3	5.2	1.2	13.1	10.2	1.3	5.2	10.1	27.4	12.8	19.4	3.5	3.8	4.7	1.0	5.2	1.6	6.1	91.1	136.5	0.6	1.0	0.2	0.3	0.1	0.9	1.0	0.7	0.7	1.3	9.7
	Decembre 09	Io	0.0	0.9	0.2	1.3	0.0	4.6	1.6	18.1	18.2	2.3	7.1	12.9	37.9	15.2	25.1	5.1	6.1	6.6	1.4	7.5	3.1	5.8	123.4	180.9	0.3	0.7	0.3	0.2	0.1	1.5	1.8	1.5	1.1	1.5	13.0
		Lt	2.9	1.4	0.9	3.4	0.5	10.4	2.0	33.8	28.3	2.4	8.2	20.3	71.0	66.8	61.2	5.3	8.2	5.0	1.1	4.5	2.0	5.4	198.6	345.0	1.5	2.2	0.7	0.6	0.6	3.0	3.3	1.2	3.0	2.5	12.4
	Janvier 10	Ey	2.2	0.5	0.0	1.2	0.1	2.9	1.1	11.9	9.9	1.3	3.7	7.7	27.3	19.9	23.0	2.0	3.0	2.6	0.8	3.0	0.8	5.1	76.9	130.1	0.9	1.4	0.1	0.2	0.2	0.4	0.4	0.6	0.1	0.5	9.0
		Ar	0.5	0.6	0.2	1.1	0.1	3.2	0.9	12.1	9.5	1.0	3.2	7.9	27.4	16.6	19.0	2.0	3.6	2.6	0.7	2.6	0.9	3.4	74.4	119.0	0.1	0.3	0.2	0.1	0.3	0.8	1.0	0.4	1.2	0.8	6.9
	Mars 10	Bé	0.7	2.2	2.2	3.0	0.2	9.0	3.1	56.5	50.0	4.8	25.8	35.4	110.9	54.2	63.2	11.3	8.5	8.5	1.9	9.0	3.9	6.5	329.8	471.1	0.7	1.1	0.7	0.3	0.7	3.9	3.5	1.3	2.8	3.5	27.5
		qB	2.1	1.0	0.7	2.5	0.7	10.5	1.5	49.2	136.1	4.7	10.7	28.5	73.1	4.7	32.5	7.1	5.9	7.6	2.0	12.8	2.4	7.9	345.5	404.3	0.5	0.9	2.4	1.4	1.5	5.7	6.2	1.2	6.6	5.3	25.5
Mars 10	Io	0.6	1.3	0.2	1.3	0.3	5.8	2.5	26.1	25.8	2.5	10.5	19.9	59.4	4.8	20.9	8.8	5.0	11.4	3.1	11.9	5.9	8.5	188.8	236.8	0.7	1.2	0.5	0.4	0.3	1.2	2.1	0.8	1.0	0.8	16.3	
	Lt	0.7	1.4	0.0	0.5	0.4	6.5	1.6	39.6	43.4	3.8	15.8	28.9	86.0	5.2	28.1	13.2	7.4	16.3	4.3	15.9	8.1	11.1	274.1	338.2	3.7	4.3	0.7	0.5	0.4	2.7	2.4	1.5	0.7	1.3	21.6	
Mars 10	Ey	4.7	1.4	0.1	1.1	0.8	7.4	3.0	32.7	36.7	4.0	13.7	24.9	75.2	4.9	26.1	10.7	6.0	12.6	4.0	14.4	5.0	10.6	242.5	299.9	5.8	8.3	1.9	2.4	1.7	5.4	6.3	2.4	12.6	4.6	23.7	
	Ar	0.5	0.5	0.3	1.7	0.3	5.6	1.1	15.0	9.7	1.1	3.9	9.0	20.9	1.4	7.2	3.3	2.5	4.8	1.0	4.3	2.4	5.2	81.7	101.8	0.3	1.2	0.4	0.4	0.2	1.1	1.3	0.8	0.6	1.4	5.9	
Mars 10	Bé	0.4	0.9	0.3	1.0	0.5	7.7	1.0	26.4	21.9	2.3	9.1	14.1	36.4	2.9	12.0	8.3	4.2	8.0	2.0	8.3	4.6	6.3	145.9	178.8	0.7	1.3	0.5	0.3	0.3	1.7	2.1	0.5	0.9	1.3	11.2	
	qB	1.1	1.6	0.1	1.4	0.5	9.5	1.7	33.5	49.9	1.0	10.4	19.5	45.6	1.0	15.9	0.9	2.2	4.6	1.0	5.5	0.0	3.3	181.5	205.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	2.1	3.2	0.3	3.2	2.8	12.6	
Mars 10	Io	0.0	2.2	0.4	0.9	0.0	9.6	0.5	40.3	70.2	2.2	21.6	31.1	82.5	2.2	24.3	4.8	3.9	13.1	2.6	12.6	4.7	5.2	292.4	334.8	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	1.9	3.2	0.3	2.6	2.6	21.0	
	Lt	0.0	2.5	8.8	2.9	7.8	14.2	0.8	42.7	72.7	0.0	23.6	31.6	82.2	2.8	24.2	6.1	4.1	15.0	3.1	14.2	7.0	7.6	320.3	373.8	0.0	0.0	7.1	0.1	5.8	3.0	3.6	0.5	2.8	2.8	22.0	
Mars 10	Ey	0.0	2.0	0.9	1.6	7.3	11.3	0.6	36.6	60.5	0.0	17.6	29.4	78.9	2.3	23.6	4.0	3.0	12.3	2.7	11.8	4.8	4.8	270.1	315.9	0.0	0.0	23.8	0.0	35.6	4.4	5.0	0.5	7.1	3.7	21.2	
	Ar	0.0	0.4	0.4	0.0	5.2	3.7	0.0	17.0	10.7	0.0	2.2	14.2	18.6	0.5	6.2	0.7	0.9	2.2	0.4	2.3	0.9	2.7	72.7	89.0	0.0	0.0	2.8	0.0	1.1	0.9	1.7	0.1	0.8	2.0	7.7	
Mars 10	Bé	0.0	1.1	0.9	1.3	19.8	5.6	0.0	28.0	32.7	0.0	9.9	20.3	32.0	1.1	9.3	2.8	1.4	5.1	0.9	4.7	1.7	3.2	145.3	181.8	0.0	0.0	11.1	2.9	22.9	1.5	2.8	0.2	2.6	2.9	12.1	
	qB	0.0	1.6	1.5	2.3	0.2	14.4	0.5	48.7	57.3	0.5	12.2	36.7	51.6	1.6	17.1	1.1	1.8	4.8	1.6	5.2	2.0	3.7	239.4	266.4	0.0	0.0	2.4	2.1	1.8	4.9	6.1	0.3	4.9	6.1	22.4	
Mars 10	Io	0.0	1.6	0.6	0.3	1.7	9.6	0.0	34.9	54.6	0.4	14.5	22.6	57.2	1.8	16.4	2.8	2.4	7.3	1.6	6.9	3.0	4.5	214.6	244.8	0.0	0.0	1.7	0.0	1.4	2.8	4.1	0.2	3.0	3.8	8.1	
	Lt	0.0	1.8	0.0	1.5	0.0	11.8	0.7	32.7	51.4	1.7	13.9	22.3	47.6	1.9	13.8	4.7	2.4	6.9	1.5	6.5	3.2	3.2	203.5	229.7	0.0	0.0	0.1	0.1	1.2	2.8	4.3	0.3	4.5	3.7	14.4	
Mars 10	Ey	0.0	2.3	0.0	1.1	0.0	18.2	1.0	47.5	75.8	3.5	20.8	38.7	77.2	2.8	23.7	5.1	3.1	10.1	2.2	9.9	3.5	4.2	309.9	350.6	0.0	0.0	4.9	2.1	3.7	15.6	16.3	0.8	17.5	12.8	31.1	
	Ar	0.0	0.3	0.0	0.6	0.0	3.9	0.0	12.8	7.7	0.4	3.1	11.4	13.3	0.4	4.8	0.4	0.4	1.0	0.2	1.3	0.5	0.0	56.1	62.6	0.0	0.0	0.2	0.7	0.4	1.5	1.5	0.0	1.8	1.8	7.8	
Mars 10	Bé	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	20.0	25.7	0.8	5.6	14.9	26.1	1.1	8.4	2.7	1.0	4.4	0.7	4.2	5.0	0.0	105.7	122.1	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.6
	qB	0.0	0.9	0.0	0.6	0.0	6.1	0.6	24.9	26.4	0.0	3.3	18.2	22.4	0.9	12.6	0.3	0.6	2.2	0.6	2.5	2.2	0.0	109.1	125.3	0.0	0.0	1.3	0.9	1.0	2.8	3.2	0.0	3.9	3.1	8.1	
Mars 10	Io	0.0	2.4	0.0	1.6	0.0	8.6	1.2	36.0	64.1	1.6	19.6	29.9	59.6	2.3	22.4	5.2	2.3	11.1	2.1	10.9	10.7	0.0	252.3	291.6	0.0	0.0	0.5	0.8	0.3	2.6	2.5	0.0	3.0	2.3	18.8	
	Lt	0.0	1.7	0.0	0.3	0.0	4.1	0.5	35.3	59.2	1.2	15.3	25.7	50.3	2.1	15.1	4.9	2.0	9.5	1.8	8.5	9.3	0.0	217.2	247.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.4	1.6	2.1	0.0	3.0	2.0	16.4	

Programme	Temps	Site	Napht.	Acnaphth.	Acenaphth.	Fluo.	Dibenzo.	Phénan.	Anthra.	Fluoran.	Pyr.	2,1 d BNT	B(a)	Triph. + Chrys.	B(b),k(f)	B(a)F	B(e)P	B(a)P	Perylene	IP	D(hac)A	BP	Da(j)P	Cor	Somme 16 HAP	Somme totale	2 MN	1 MN	4 MBRT	3 + 2 MBRT	1 MBRT	3 MP	2 MP	2 MA	9 MP + 1 MA	1 MP	M Chrys		
ASCOBAR année 2 - Sédiments (ng/g, ps)	Juillet 09	Ar	0,2	0,3	0,0	0,1	0,1	1,1	0,6	3,8	2,9	0,4	1,9	2,5	5,7	0,5	2,1	2,6	1,1	3,1	0,5	2,2	2,2	1,6	35,5	35,5	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	1,3	
		Bé	1,2	2,5	0,3	0,8	10,9	0,6	10,9	7,5	44,6	36,7	4,2	24,7	23,3	48,5	5,1	17,8	26,1	9,3	25,5	4,6	18,4	17,1	10,9	275,7	340,6	0,9	0,5	0,3	0,3	0,2	1,9	2,6	0,9	1,7	1,8	14,0	
		Gb	2,1	24,8	0,4	2,7	2,4	59,1	28,4	335,2	261,9	335,2	31,9	265,7	187,6	393,5	55,2	129,6	209,3	68,3	177,4	35,7	111,3	119,5	67,3	2095,0	2569,2	0,5	0,4	1,5	2,1	1,0	17,5	22,4	15,1	21,0	14,0	140,5	
		Io	3,3	23,8	1,0	3,0	30,9	45,5	220,9	202,8	202,8	202,8	16,4	140,3	104,2	199,8	26,7	77,3	133,6	45,8	106,4	17,0	88,0	59,2	48,5	1320,4	1597,0	0,5	0,8	0,8	1,0	0,5	6,4	6,3	5,8	7,1	5,6	45,5	
		Lt	3,7	7,4	0,5	2,4	1,4	26,6	13,4	105,9	86,2	105,9	10,3	56,4	60,5	120,1	13,3	45,3	69,1	22,5	62,6	9,1	45,1	40,3	28,2	660,8	830,1	0,9	0,5	0,5	0,3	0,2	3,3	4,9	2,0	2,9	3,7	29,5	
		Ar	0,6	1,7	0,1	0,2	1,1	2,2	2,1	8,5	8,8	8,8	1,2	5,7	6,9	13,0	1,4	5,1	6,6	2,7	6,5	1,2	4,8	4,9	3,5	69,0	87,9	0,5	0,3	0,2	0,1	0,1	0,9	1,2	0,5	1,1	0,8	7,5	
	Octobre 09	Bé	10,3	100,3	11,0	160,4	110,6	1009,9	225,8	1038,0	659,8	167,6	521,6	498,7	755,4	91,0	247,9	369,6	97,3	288,7	75,4	171,8	224,1	119,6	5896,8	6954,8	10,4	11,6	13,2	15,5	2,5	99,0	98,5	23,9	46,3	43,2	215,5		
		Gb	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,4	0,1	0,8	2,3	0,2	0,3	0,3	0,4	9,1	0,1	0,4	0,4	0,2	0,5	0,1	0,5	0,4	0,5	15,2	19,9	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,3
		Io	2,6	11,2	0,9	4,8	3,7	57,1	33,4	212,4	162,5	182	98,8	88,5	183,2	21,5	64,8	104,0	32,0	84,2	11,4	57,7	58,2	38,4	1112,6	1349,5	1,1	0,9	1,1	1,3	0,5	8,8	11,1	4,1	8,3	7,1	47,7		
		Lt	28,5	130,9	8,2	75,2	86,2	1096,3	3093,4	3430,8	2697,4	407,0	2436,9	407,0	1918,5	2921,6	446,2	1063,5	1224,6	533,0	1304,3	376,4	921,9	1052,6	586,9	21718,6	25894,0	9,5	3,4	25,8	36,9	15,5	223,5	187,5	269,9	197,2	136,5	974,2	
		Ar	2,0	1,7	0,3	0,9	0,6	6,4	1,4	16,8	14,4	14,4	2,7	18,3	10,6	28,1	3,5	9,2	11,3	12,9	25,9	2,8	11,7	13,6	3,0	152,6	198,1	2,1	1,2	0,4	0,3	0,1	1,7	2,5	1,2	2,3	1,6	6,7	
		Bé	1,4	9,2	2,5	10,3	8,6	74,5	25,6	109,6	97,3	11,6	104,9	44,4	100,2	19,8	35,0	61,4	45,2	96,6	6,8	48,3	29,7	14,6	792,9	957,5	0,6	0,7	1,7	2,3	0,8	10,6	12,7	7,1	10,3	7,2	31,9		
Janvier 10	Gb	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,5	0,1	0,0	0,3	0,2	0,6	0,0	0,2	0,2	0,2	0,4	0,0	0,2	0,0	0,0	2,8	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	Io	5,4	17,9	9,3	23,9	15,1	132,9	45,1	208,6	181,3	208,6	29,7	236,3	103,6	267,1	51,1	91,1	134,7	108,8	221,3	19,1	102,3	109,3	28,7	1708,6	2142,4	5,0	5,3	3,7	5,2	1,8	26,9	29,0	16,2	22,7	16,8	99,8		
	Lt	1,9	3,8	0,6	2,7	2,2	23,3	8,0	63,0	53,7	63,0	8,6	41,4	32,2	74,5	10,5	26,6	39,0	19,3	34,3	11,9	27,7	20,9	4,6	417,9	510,6	1,0	0,6	0,8	0,9	0,3	5,6	5,4	2,4	3,7	3,1	20,7		
	Ar	0,0	0,1	0,1	0,0	0,4	0,0	0,0	2,3	1,3	1,3	0,0	0,7	0,7	1,6	0,1	0,5	0,7	0,2	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	8,8	19,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0		
	Bé	0,2	0,2	0,0	0,2	0,2	2,5	0,3	4,8	4,1	4,1	0,5	2,2	2,0	4,8	0,5	1,8	1,9	1,1	2,2	0,6	1,9	1,5	0,4	28,1	34,0	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,4	0,5	0,1	0,4	0,3	1,3		
	Gb	0,1	0,0	0,0	0,0	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,3	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	4,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
Mars 10	Io	1,3	2,1	0,8	2,5	1,9	22,2	7,8	18,9	37,5	6,7	28,2	29,2	48,9	8,1	19,1	29,7	8,5	19,1	6,9	17,5	17,0	7,2	272,5	341,0	0,7	0,5	0,5	0,6	0,2	3,9	5,2	2,0	4,0	2,5	21,1			
	Lt	6,1	15,2	1,9	14,2	9,3	94,6	27,1	200,5	165,4	23,5	129,6	91,9	221,3	37,7	83,8	117,0	69,1	69,1	107,9	46,4	87,5	71,7	20,4	1326,8	1642,3	3,7	2,9	2,3	3,4	1,1	17,2	21,8	9,7	16,2	12,0	78,5		

Programme	Temps	Site	OSQVAr année 1 - Huîtres cultivées (ng/g, ps)																Somme 16 HAP	Somme totale	2 MN	1 MN	4 MDRT	3 + 2 MDRT	1 MDRT	3 MR	2 MR	2 MA	9 MR + 1 MA	1 MR	M Chys								
			Naph.	Acenaphth.	Fluo.	Dibenzo.	Phenan.	Anthra.	Fluoran.	Pyr.	2,1 d BNT	BaA	Ttrph. + Chrys.	B(b)kF	BaF	B(e)P	BaP	Perylene														IP	Dah(a)A	BP	D(a)P	Cor			
OSQVAr année 1 - Huîtres cultivées (ng/g, ps)	Mars 10	Ar	1,2	2,8	0,0	0,0	0,0	0,5	10,5	1,5	51,3	74,7	9,6	17,8	62,8	119,7	3,2	38,9	4,9	2,9	11,5	3,0	11,6	0,0	1,2	373,3	429,5	0,7	0,2	0,5	0,3	0,5	3,1	3,4	0,4	3,0	2,8	0,0	
		Ar	3,3	0,2	0,0	0,0	0,2	4,3	0,2	10,7	7,1	10,7	7,1	0,9	3,6	8,6	13,0	0,2	3,5	0,5	0,8	1,5	0,0	1,4	0,0	0,0	54,4	60,0	1,4	0,6	0,1	0,1	0,1	1,4	1,9	0,3	1,1	1,1	0,0
		Ar	3,7	0,6	0,2	0,4	0,2	6,1	0,6	26,0	25,4	8,8	22,3	3,8	8,8	22,3	3,8	0,6	12,2	1,3	1,6	3,6	0,8	3,3	0,0	1,5	141,7	160,4	1,6	0,9	0,3	0,2	0,2	3,1	2,2	0,5	2,6	2,1	0,0
	Juillet 10	Ar	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	3,1	0,4	21,0	28,7	0,8	6,0	16,4	32,3	1,0	10,3	2,4	1,4	3,7	0,7	3,2	2,8	0,0	0,0	118,8	135,1	0,0	0,0	0,2	0,6	0,0	1,5	2,2	0,0	2,6	1,6	8,8	
		Ar	0,0	1,1	0,0	0,8	0,0	4,7	0,8	24,5	40,0	1,7	13,9	26,4	53,6	1,5	26,1	3,7	2,1	5,2	1,1	5,2	4,2	0,0	0,0	181,1	219,6	0,0	0,0	1,0	0,8	0,6	2,3	3,5	0,0	3,6	2,0	15,1	
		Ar	0,0	1,0	0,0	0,6	0,0	0,9	0,5	23,4	36,3	1,3	12,8	24,8	51,1	1,7	15,4	3,1	2,1	6,0	1,1	5,6	4,2	0,0	0,0	167,2	191,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	1,7	1,8	0,5	1,8	1,3	14,5
	Octobre 10	Ar	3,6	0,9	0,0	0,4	0,1	6,3	0,9	38,0	44,7	4,1	15,0	36,2	80,9	1,1	26,6	1,7	2,2	5,9	1,4	6,8	0,0	1,6	242,6	278,3	1,9	0,9	0,8	0,1	0,6	4,6	6,6	0,9	5,4	4,0	0,0		
		Ar	0,0	0,9	0,0	0,6	0,0	3,5	0,4	19,0	29,6	0,7	7,7	14,7	40,7	1,2	12,4	2,9	2,1	6,0	1,1	5,3	4,2	6,8	132,3	159,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	2,2	2,3	0,7	1,9	1,4	10,0		
		Ar	0,0	0,6	0,0	1,2	0,0	4,6	0,6	17,0	27,9	0,9	2,8	10,4	33,2	0,8	12,1	2,2	1,4	4,3	0,9	4,4	3,3	0,0	110,1	128,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	2,9	2,5	0,4	1,7	1,8	9,6		
	Octobre 10	Ar	0,0	1,7	0,0	0,5	0,0	3,9	0,8	28,8	49,7	1,9	13,4	20,6	63,7	2,7	17,4	6,3	3,2	11,4	2,2	9,7	212,8	237,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	1,7	1,9	0,6	2,8	1,4	16,8				
		Ar	0,0	1,9	0,0	0,5	0,0	5,4	0,8	35,4	59,2	2,4	19,9	25,5	78,1	2,9	22,0	9,0	4,0	15,5	3,5	13,1	12,4	0,0	267,9	311,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	1,7	2,7	0,5	2,1	1,7	24,3		
		Ar	0,0	1,5	0,0	1,4	0,0	4,1	1,0	33,2	64,8	2,7	13,9	29,5	83,2	1,7	25,8	3,7	2,3	11,0	2,1	10,5	7,2	0,0	260,2	299,9	0,0	0,0	0,1	0,0	0,8	2,4	3,0	1,4	5,8	2,5	30,7		
Février 11	Ar	0,0	0,5	0,4	0,7	0,0	10,6	0,5	27,9	13,9	0,9	2,5	18,2	21,3	0,0	8,8	2,9	1,0	3,6	0,8	4,5	2,7	7,0	108,4	128,8	0,0	0,0	0,8	0,6	0,6	1,4	3,0	0,0	2,7	2,7	5,0			
	Ar	0,0	1,1	0,3	1,4	0,0	7,2	0,5	32,1	28,1	1,2	5,1	20,1	34,6	1,1	11,3	2,8	1,1	3,8	1,0	3,9	1,4	7,3	142,0	165,4	0,0	0,0	0,7	0,5	1,3	1,3	3,0	0,0	2,2	2,6	12,1			
	Ar	0,0	2,1	0,3	1,3	0,0	9,4	1,1	58,0	67,0	0,0	17,9	35,6	66,2	2,0	19,3	3,0	1,7	9,0	2,0	9,0	4,4	11,3	281,8	320,7	0,0	0,0	1,1	0,3	0,6	1,7	4,0	0,0	3,9	4,3	19,5			
Mars 10	Ar	0,0	4,3	0,5	2,2	0,0	13,0	3,0	79,5	95,1	4,0	47,3	50,5	96,6	8,2	27,7	22,6	7,1	23,2	4,7	19,2	11,9	19,9	461,7	540,5	0,0	0,0	0,8	0,5	0,6	3,0	5,4	0,7	8,5	3,6	29,3			
	Ar	0,0	2,2	0,4	1,9	0,0	10,2	1,1	57,3	68,4	2,8	19,7	37,1	67,8	2,2	21,4	3,9	2,3	10,6	2,3	9,9	4,8	8,8	292,9	335,2	0,0	0,0	3,9	1,0	2,4	4,1	6,9	0,2	9,5	6,5	7,3			
	Ar	6,6	0,1	0,0	0,1	0,1	1,0	0,4	2,6	2,1	0,2	0,8	1,3	3,3	0,4	1,2	1,7	0,9	2,2	0,6	2,0	1,5	1,6	24,6	30,6	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	0,2	0,1	0,4	0,2	0,2	1,2		
Mars 10	Ar	0,2	0,2	0,0	0,2	0,2	2,5	0,3	4,8	4,1	0,5	2,2	2,0	4,8	0,5	1,8	1,9	1,1	2,2	0,6	1,9	1,5	0,4	28,1	34,0	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,4	0,5	0,1	0,4	0,3	1,3			
	Ar	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,3	0,2	0,0	0,1	0,1	0,4	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,0	0,4	0,1	0,6	2,3	3,3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
	Ar	1,3	2,1	0,8	2,5	1,9	22,2	7,8	18,9	37,5	6,7	28,2	29,2	48,9	8,1	19,1	29,7	8,5	19,1	6,9	17,5	17,0	7,2	272,5	341,0	0,7	0,5	0,5	0,6	0,2	3,9	5,2	2,0	4,0	2,5	21,1			
Juillet 10	Ar	6,1	15,2	1,9	14,2	9,3	94,6	27,1	200,5	165,4	23,5	129,6	91,9	221,3	37,7	83,8	117,0	69,1	107,9	46,4	87,5	71,7	20,4	1326,8	1642,3	3,7	2,9	2,3	3,4	1,1	17,2	21,8	9,7	16,2	12,0	78,3			
	Ar	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,4	0,3	0,0	0,1	0,2	0,4	0,0	0,1	0,2	0,0	0,2	0,0	0,2	0,1	0,5	2,3	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
	Ar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,3	0,6	0,0	0,2	0,2	0,2	0,4	0,0	0,2	0,1	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2	2,4	3,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
Juillet 10	Ar	1,9	13,2	3,9	22,3	14,0	135,2	62,2	238,6	279,9	6,9	192,8	151,6	202,9	34,2	63,2	96,6	32,0	79,2	27,9	67,6	149,8	56,0	1575,8	1931,8	1,7	1,4	3,7	4,9	0,9	22,5	26,5	14,8	18,3	12,3	104,5			
	Ar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,6	1,6	0,1	0,7	0,6	1,4	0,1	0,7	0,5	0,2	0,5	0,1	0,4	0,6	0,3	6,6	8,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			
	Ar	4,2	6,9	1,6	4,7	4,0	37,7	10,9	97,2	131,5	14,3	101,3	88,9	140,0	18,4	46,9	55,4	23,8	62,6	18,6	52,3	417,6	59,6	813,8	1398,4	3,2	2,0	1,5	1,8	0,6	9,1	8,4	4,0	9,9	4,6	74,9			
Octobre 10	Ar	0,0	0,3	0,0	0,1	0,1	1,6	0,3	4,7	4,9	0,4	3,3	3,2	6,7	0,6	2,3	2,1	0,8	2,5	0,6	2,2	5,1	1,6	32,4	43,2	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,4	0,5	0,1	0,3	0,2	1,7			
	Ar	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,9	1,3	0,0	0,5	0,6	1,3	0,1	0,5	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	0,5	0,4	6,7	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3			
	Ar	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	0,1	0,7	0,7	0,1	0,3	0,3	0,3	0,8	0,1	0,3	0,4	0,1	0,4	0,1	0,3	0,2	0,2	4,4	5,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0		
Octobre 10	Ar	3,4	28,9	9,3	69,0	34,4	318,8	142,6	235,0	166,1	30,2	160,7	144,4	262,6	44,4	95,1	146,1	42,5	112,9	40,5	92,4	83,3	39,1	1932,8	2301,8	7,0	3,4	7,7	12,3	0,0	58,0	56,1	38,2	48,9	29,2	129,9			
	Ar	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,4	0,5	0,0	0,1	0,2	0,6	0,0	0,2	0,3	0,1	0,3	0,1	0,2	0,0	0,0	3,1	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0			
	Ar	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	1,3	0,5	6,3	5,4	0,6	3,1	3,9	7,1	0,8	2,8	3,8	1,2	3,1	0,6	2,8	1,4	0,9	38,7	46,4	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,4	0,2	0,3	0,2	2,3			
Février 11	Ar	1,5	2,1	0,6	2,0	1,9	20,8	8,5	52,9	45,4	7,3	31,1	32,4	53,3	7,3	20,8	33,3	9,9	23,3	5,8	20,2	11,7	5,9	333,1	397,9	0,4	0,2	1,1	1,2	0,4	5,3	5,5	2,5	3,9	3,1	22,5			
	Ar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,8	0,9	0,1	0,3	0,4	0,9	0,1	0,3	0,5	0,1	0,4	0,1	0,4	0,2	0,2	5,0	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2			
	Ar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,6	0,7	0,0	0,2	0,3	0,8	0,0	0,3	0,3	0,1	0,3	0,1	0,3	0,0	0,5	3,9	4,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0			
Février 11	Ar	0,6	1,9	0,4	1,8	1,4	15,0	2,3	30,0	33,6	1,8	17,1	17,1	29,3	2,6	8,6																							

Programme	Temps	Site	Napht.	Acénaphth.	Acénaphth.	Fluo.	Dibenzo.	Phéna.	Anthra.	Fluoran.	Pyr.	2,1 d BNT	B(a)A	Triph. + Chrys.	B(b),k)F	B(a)F	B(e)P	B(a)P	Perylene	IP	Dah(a)A	BP	D(a)P	Cor	Somme 16 HAP	Somme totale	2 MN	1 MN	4 MDRT	3 + 2 MDRT	1 MDRT	3 MP	2 MP	2 MA	9 MP + 1 MA	1 MP	M Chrys												
OSQAR année 2 - Sédiments (mg/g, ps)	Avril 11	AR	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	1700,8	9,8	2,9	2,1	4,3	4,6	1,9	19,5	24,4	11,6	18,4	0,0	0,0	0,0	111,6										
		AR	5,2	21,1	4,1	20,9	124,1	38,8	260,6	291,7	20,4	200,2	137,8	258,4	41,7	76,9	116,2	44,1	108,4	31,6	81,7	78,1	122,8	5,8	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1						
		GB	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,4	0,0	1,1	0,1	0,1	0,6	1,4	0,0	0,5	0,4	0,2	0,5	0,1	0,5	0,6	0,9	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0		
		IO	2,7	9,6	5,0	14,0	12,0	84,3	21,4	166,4	198,7	10,6	95,0	75,3	144,8	21,1	45,7	68,1	26,6	62,2	13,3	49,5	49,1	64,4	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0		
		LT	1,7	3,8	0,4	2,6	1,3	16,5	12,3	52,4	62,7	4,9	44,2	43,0	34,0	8,0	17,5	25,1	9,7	24,8	6,3	18,7	17,8	21,5	3,8	4,2	0,8	0,4	0,5	0,4	0,2	3,6	4,2	4,5	3,6	1,9	22,8	0,8	0,4	0,5	0,4	0,2	3,6	4,2	4,5	3,6	1,9	22,8	
		AY	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,3	0,4	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,3	1,3	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
		AR	0,4	0,1	0,0	0,1	0,1	0,2	0,4	5,4	4,3	0,5	2,9	2,9	6,1	0,8	2,3	3,5	1,0	4,8	0,7	2,7	2,5	1,1	35,5	43,9	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2			
		AR	1,6	1,5	0,1	1,0	1,4	32,4	19,3	111,5	86,3	7,8	64,9	44,8	84,1	11,3	30,5	52,4	16,1	57,6	8,3	32,4	25,7	11,7	598,3	702,9	0,4	0,2	0,6	0,7	0,3	4,7	6,7	1,9	4,9	3,5	20,5	0,4	0,2	0,6	0,7	0,3	4,7	6,7	1,9	4,9	3,5	20,5	
		GB	0,6	0,2	0,1	0,3	0,5	9,3	1,0	10,8	8,3	0,7	3,5	4,5	8,0	0,6	3,3	7,9	1,2	5,8	0,8	3,4	2,7	1,3	64,6	74,8	0,3	0,2	0,6	0,5	0,3	1,0	5,1	0,2	1,8	1,0	2,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		IO	0,6	0,7	0,3	0,4	0,3	5,8	1,7	25,0	19,7	1,6	12,1	10,3	23,0	3,1	8,5	24,2	3,7	17,3	2,3	9,8	7,7	3,7	153,2	181,9	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,7	1,0	0,2	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	
		LT	2,7	3,2	0,3	1,6	2,4	52,3	17,0	159,0	119,3	10,1	82,0	61,3	117,5	15,9	41,6	69,7	19,0	74,9	11,9	40,9	36,5	14,5	813,5	953,6	0,8	0,5	0,7	0,9	0,4	6,4	9,0	2,8	6,0	4,9	26,9	0,8	0,5	0,7	0,9	0,4	6,4	9,0	2,8	6,0	4,9	26,9	
		AY	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,2	0,0	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	1,5	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
AR	0,4	0,4	0,2	0,4	0,3	3,3	1,8	10,6	13,0	0,4	6,4	5,8	11,9	0,9	3,7	5,4	1,8	5,7	1,0	4,1	0,0	3,5	70,3	81,1	0,4	0,2	0,1	0,1	0,0	0,6	0,8	0,3	0,7	0,3	0,7	0,3	0,7	0,3	0,7	0,3	0,7	0,3	0,7	0,3	0,7				
BE	0,2	2,2	0,2	1,4	0,9	12,7	3,5	35,3	39,9	3,6	24,8	20,3	34,0	3,8	10,0	14,1	4,5	11,7	3,5	9,0	8,4	9,0	212,7	252,9	0,1	0,1	0,5	0,5	0,1	4,2	3,5	1,3	3,8	1,5	12,8	0,1	0,1	0,5	0,5	0,1	4,2	3,5	1,3	3,8	1,5	12,8			
GB	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,3	0,6	0,0	0,1	0,2	0,4	0,0	0,2	0,1	0,0	0,2	0,0	0,2	0,2	0,4	2,4	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0				
IO	2,4	3,8	0,4	2,0	2,9	19,1	15,4	86,4	118,6	5,3	54,8	40,9	76,0	11,2	25,8	38,9	16,4	37,2	6,9	33,6	37,0	45,8	536,4	680,7	0,4	0,1	0,5	0,6	0,3	4,1	3,8	3,5	4,5	2,5	18,6	0,4	0,1	0,5	0,6	0,3	4,1	3,8	3,5	4,5	2,5	18,6			
LT	4,7	6,1	0,9	0,7	4,8	55,3	23,0	166,0	206,3	10,0	131,5	91,4	174,5	31,4	55,7	87,3	35,0	79,2	18,1	61,4	106,7	96,2	1106,3	1446,1	2,0	0,8	1,3	1,4	0,6	15,2	12,0	12,1	17,3	6,0	64,5	2,0	0,8	1,3	1,4	0,6	15,2	12,0	12,1	17,3	6,0	64,5			
AY	2,9	0,7	0,0	0,0	0,1	1,5	3,4	8,1	11,3	0,7	7,4	6,9	13,6	1,5	4,5	7,4	2,5	6,5	0,8	6,2	3,2	7,4	76,6	96,5	1,0	0,7	0,1	0,0	0,0	0,2	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2			
AR	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,3	2,4	3,2	0,5	3,7	3,8	5,6	0,5	2,6	2,6	0,7	1,6	0,4	3,3	0,0	0,5	28,4	33,3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2				
BE	2,3	4,5	3,3	2,1	2,0	17,2	7,2	30,8	37,9	5,4	44,8	24,0	45,8	6,2	14,7	21,5	8,6	15,7	4,5	14,8	10,4	51,4	251,7	303,8	3,4	2,7	5,5	7,6	2,3	36,6	43,9	20,9	27,6	25,0	125,7	3,4	2,7	5,5	7,6	2,3	36,6	43,9	20,9	27,6	25,0	125,7			
GB	1,4	0,6	0,3	0,7	0,5	6,4	1,8	15,2	20,7	1,6	10,0	12,5	25,6	1,8	8,1	9,1	5,4	8,7	1,7	8,7	13,6	4,2	123,3	158,6	1,0	0,5	0,2	0,1	0,1	1,2	1,7	0,6	1,1	1,0	5,5	1,0	0,5	0,2	0,1	1,2	1,7	0,6	1,1	1,0	5,5				
IO	0,2	0,2	0,0	0,2	0,1	2,0	0,3	5,9	8,0	0,6	3,0	4,4	8,4	0,4	4,1	2,4	0,9	10,0	1,0	10,3	0,0	0,0	56,3	62,4	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,3	0,4	0,1	0,3	0,2	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0				
LT	0,9	0,6	0,3	0,8	0,8	11,3	2,7	23,5	31,6	2,5	16,4	17,0	30,6	1,8	9,6	12,4	4,7	9,9	1,9	10,3	5,3	2,8	170,1	197,5	0,5	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	1,6	2,0	0,5	1,5	1,0	6,7	0,5	0,3	0,2	0,2	0,1	1,6	2,0	0,5	1,5	1,0	6,7		
AY	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,2	0,0	0,1	0,1	0,2	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,9	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					
AR	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,4	0,5	0,0	0,2	0,2	0,6	0,0	0,2	0,0	0,2	0,1	0,2	0,0	0,2	0,0	3,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0						
BE	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1	2,0	0,2	2,8	3,4	0,3	1,6	1,7	3,2	0,2	1,0	1,1	0,5	1,0	0,2	1,1	0,4	0,3	18,7	21,5	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,4	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2					
GB	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,6	0,8	0,0	0,3	0,4	1,0	0,1	0,3	0,2	0,4	0,1	0,3	0,0	0,0	0,0	4,6	5,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0						
IO	0,3	0,3	0,1	0,3	0,3	5,6	1,1	13,2	17,3	1,7	9,6	10,8	20,1	1,3	6,2	8,5	2,3	5,6	1,1	5,9	4,2	2,3	99,9	118,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	1,0	1,1	0,3	0,9	0,6	4														

3. Données « Carbone Organique Total » et « Taux lipidiques » du suivi *in-situ*

Programme	Temps	Site	TOC (%)	Taux de lipides (%)
ASCOBAR 2 (fin)	Jan. 10	Ar	0,60	11,6
		Be	0,17	6,7
		Gb	0,09	14,8
		Io	1,49	6,4
		Lt	0,40	7,0
	Mar. 10	Ar	0,14	13,6
		Bé	0,19	11,0
		Gb	0,09	13,4
		Io	0,30	10,3
		Lt	0,83	11,1
OSQUAR 1	Jul. 10	Ar	0,08	7,9
		Bé	0,27	5,5
		Gb	0,12	6,9
		Io	3,18	6,4
		Lt	0,17	6,2
		Ey	0,09	6,2
	Oct. 10	Ar	0,08	4,7
		Bé	0,15	5,3
		Gb	0,13	5,6
		Io	0,15	4,2
		Lt	0,20	6,5
	Feb. 11	Ar	0,24	8,7
		Bé	0,21	5,6
		Gb	0,10	6,5
		Io	0,15	5,2
OSQUAR 2	Jul. 11	Lt	0,47	5,8
		Ey	0,06	5,8
		Ar	0,20	7,2
		Bé	0,20	8,8
		Gb	0,13	7,6
		Io	0,17	6,0
	Oct. 11	Lt	0,31	3,6
		Ey	0,11	4,8
		Ar	0,22	9,2
		Bé	0,11	7,5
		Gb	0,09	6,7
	Jan. 12	Io	0,18	6,6
		Lt	0,25	5,9
		Ey	0,25	6,2
		Ar	0,16	8,7
Bé		0,37	10,6	
May 12	Gb	0,39	6,9	
	Io	0,15	6,6	
	Lt	0,30	6,7	
	Ey	0,04	8,0	
	Ar	0,08	11,3	
Sep. 12	Be	0,12	6,3	
	Gb	0,09	6,4	
	Io	0,09	10,0	
	Lt	0,15	8,9	
	Ey	0,15	8,6	
	Ar	0,30	11,6	
	Bé	0,18	9,5	
	Gb	0,09	3,8	
	Io	0,16	10,7	
	Lt	0,23		
	Ey	0,04		

4. Données « Croissance » du suivi *in-situ*

Paramètres de croissance ASCOBAR 2		Masse fraîche (g)		Longueur de coquille (cm)		Indice de condition	
		Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Ar	Mai 09	2,0	0,5	6,7	0,2	14,2	3,7
	Juil. 09	2,6	0,9	7,3	0,5	16,7	5,0
	Sep. 09	3,4	0,4	7,7	0,6	16,3	3,6
	Oct. 09	4,7	0,6	9,2	0,8	17,8	2,9
	Dec. 09	3,5	1,9	8,2	1,0	13,2	2,0
	Jan. 10	6,8	1,9	10,1	0,8	18,3	2,5
	Mar. 10	9,2	2,1	9,7	1,0	25,4	6,3
Be	Mai 09	3,0	0,5	6,9	0,6	18,4	4,7
	Juil. 09	3,4	0,7	7,0	0,7	18,1	3,9
	Sep. 09	2,5	0,7	7,5	0,8	10,1	1,9
	Oct. 09	3,5	0,5	7,6	0,5	15,7	1,9
	Dec. 09	3,4	1,2	8,2	1,0	12,7	1,3
	Jan. 10	3,4	0,7	8,2	1,1	13,6	1,7
	Mar. 10	6,9	1,1	8,6	0,5	24,3	3,5
Gb	Mai 09	3,1	0,7	6,5	0,6	21,7	4,3
	Juil. 09	3,4	0,3	8,5	0,9	16,9	2,6
	Sep. 09	3,3	1,3	7,1	1,0	14,4	3,2
	Oct. 09	5,3	0,9	8,1	0,8	18,1	2,7
	Dec. 09	4,8	0,9	7,9	0,5	17,5	3,5
	Jan. 10	5,9	1,5	8,6	0,7	15,6	2,4
	Mar. 10	9,1	1,5	8,1	0,8	25,6	3,2
Io	Mai 09	2,9	0,8	6,5	0,4	18,3	3,1
	Juil. 09	4,1	0,9	6,8	0,6	21,2	3,5
	Sep. 09	2,9	0,6	7,0	0,8	14,2	1,1
	Oct. 09	4,2	0,7	8,1	0,5	14,3	2,7
	Dec. 09	3,5	0,7	8,3	0,6	13,4	2,9
	Jan. 10	3,4	1,0	8,1	1,0	14,3	4,8
	Mar. 10	6,2	0,4	8,9	1,4	20,5	2,4
Lt	Mai 09	2,6	0,6	6,7	0,5	17,7	1,8
	Juil. 09	3,7	1,0	7,2	0,5	18,7	4,4
	Sep. 09	2,6	0,4	7,1	0,3	11,6	2,4
	Oct. 09	2,7	0,6	7,1	0,3	11,1	1,8
	Dec. 09	2,7	1,0	7,9	1,0	10,5	3,0
	Jan. 10	2,8	0,7	7,5	0,8	12,1	3,5
	Mar. 10	3,7	0,8	7,4	1,2	15,7	2,8
Ey	Mai 09	2,9	0,5	6,4	0,7	20,6	7,1
	Juil. 09	3,7	0,9	7,1	0,4	19,9	3,3
	Sep. 09	3,2	0,7	7,7	0,9	15,4	3,3
	Oct. 09	3,0	0,8	7,6	0,9	14,7	0,9
	Dec. 09	2,0	0,5	7,0	0,5	11,5	4,6
	Jan. 10	2,9	0,7	8,0	0,3	12,5	2,5

Paramètres de croissance OSQUAR 1		Masse fraîche (g)		Longueur de coquille (cm)		Indice de condition	
		Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Ar	Juil. 10	4,4	1,0	8,3	0,5	22,8	2,5
	Oct. 10						
	Fév. 11	8,8	1,5	10,2	0,4	20,1	3,5
Bé	Juil. 10	3,3	1,1	6,9	0,3	19,8	4,1
	Oct. 10	2,8	0,2	7,2	0,7	15,2	1,6
	Fév. 11	3,9	0,5	7,7	0,5	15,4	2,5
Gb	Juil. 10	3,5	0,6	6,8	0,9	22,7	1,2
	Oct. 10	4,4	1,1	8,1	0,8	19,5	5,7
	Fév. 11						
Io	Juil. 10	4,1	0,8	7,4	1,4	23,5	4,2
	Oct. 10	4,1	0,8	8,2	1,0	18,4	3,4
	Fév. 11	5,8	1,9	9,1	0,7	17,2	5,2
Lt	Juil. 10	3,0	0,9	6,0	0,5	22,0	4,1
	Oct. 10	3,4	1,4	7,6	0,9	13,7	4,4
	Fév. 11	3,5	1,0	7,2	0,6	15,0	5,8
Ey	Juil. 10	3,7	0,6	6,8	0,7	25,1	2,0
	Oct. 10	4,5	1,1	7,5	1,0	21,0	1,6
	Fév. 11	5,4	1,2	8,3	0,4	19,4	4,0

Paramètres de croissance OSQUAR 2		Masse fraîche (g)		Longueur de coquille (cm)		Indice de condition	
		Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Ar	Juil. 11	3,3	0,3	7,4	0,6	18,6	2,3
	Oct. 11	7,0	1,9	9,6	0,7	18,2	2,1
	Jan. 12	7,3	1,4	9,9	0,2	16,8	3,0
	Mai 12	9,3	1,6	9,8	1,5	20,5	4,9
	Sep. 12	16,6	3,9	11,7	1,9	21,9	3,3
Bé	Juil. 11	4,1	1,0	7,2	0,7	22,4	4,1
	Oct. 11	3,4	0,8	7,3	0,8	16,2	3,4
	Jan. 12	3,4	0,7	7,3	0,6	13,5	2,3
	Mai 12	6,1	0,4	8,4	0,7	16,4	5,1
	Sep. 12	6,2	0,9	9,7	0,7	13,5	1,5
Gb	Juil. 11	3,7	0,7	7,9	1,2	16,1	3,2
	Oct. 11	3,6	1,0	7,9	0,5	14,9	2,5
	Jan. 12	4,3	1,1	8,3	0,5	14,0	2,1
	Mai 12	5,6	0,9	8,3	0,9	17,5	2,4
	Sep. 12	3,6	1,5	8,8	0,7	9,7	3,2
Io	Juil. 11	3,2	1,1	7,2	1,0	16,0	3,6
	Oct. 11	3,7	0,7	8,0	1,2	15,1	3,1
	Jan. 12	3,1	0,7	8,2	1,3	11,6	1,5
	Mai 12	5,1	1,8	8,2	0,5	15,8	2,3
	Sep. 12	7,4	2,5	9,9	1,8	14,9	2,6
Lt	Juil. 11	2,9	0,7	7,3	0,6	13,2	3,3
	Oct. 11	3,6	0,6	7,6	1,0	16,0	2,0
	Jan. 12	3,1	1,0	7,9	1,0	10,3	1,7
	Mai 12	4,0	1,4	7,4	0,3	15,7	4,5
	Sep. 12						
Ey	Juil. 11	2,7	0,2	6,4	0,6	15,7	2,4
	Oct. 11	4,1	0,7	7,2	0,4	17,5	4,0
	Jan. 12	2,8	0,3	6,0	0,6	11,6	2,1
	Mai 12	4,0	0,9	7,9	0,6	13,2	1,9

5. Données « Métaux » du suivi *in-situ*

Concentrations en cuivre ASCOBAR 2		Cu branchies ($\mu\text{g/g}$, ps)		Cu glande digestive ($\mu\text{g/g}$, ps)		Cu restes ($\mu\text{g/g}$, ps)	
		Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard
Ar	Mai 09	172,3	37,3	75,3	18,1	109,3	18,7
	Juil. 09	204,4	41,7	204,9	43,4	93,1	12,3
	Sep. 09	172,1	19,5	124,0	18,7	141,3	20,3
	Oct. 09	136,9	33,9	181,4	98,6	110,9	18,9
	Dec. 09	175,3	25,1	154,2	13,8	120,3	10,3
	Jan. 10	140,9	20,2	102,2	5,9	58,7	20,4
	Mar. 10	140,8	16,3	54,8	4,1	70,5	6,9
Bé	Mai 09	118,3	25,6	81,6	16,5	105,3	16,8
	Juil. 09	360,0	18,4	157,6	31,5	142,4	20,7
	Sep. 09	249,2	29,6	156,2	30,5	185,7	15,5
	Oct. 09	255,4	33,3	131,9	25,6	137,2	17,2
	Dec. 09	265,6	25,0	86,7	17,7	127,4	23,2
	Jan. 10	249,6	32,5	222,7	16,9	199,6	20,3
	Mar. 10	210,5	19,6	64,1	5,9	114,6	8,0
Gb	Mai 09	176,6	7,2	97,3	5,3	94,4	5,8
	Juil. 09	329,1	63,4	160,1	23,0	112,7	16,6
	Sep. 09	213,5	18,2	121,3	11,8	107,2	12,1
	Oct. 09	133,0	26,7	71,6	18,8	79,5	14,1
	Dec. 09	164,2	23,3	87,9	9,7	68,6	8,4
	Jan. 10	194,6	16,6	137,0	12,6	89,3	22,5
	Mar. 10	192,1	21,5	62,2	8,4	67,6	4,6
Io	Mai 09	269,2	49,3	101,9	10,8	133,9	24,4
	Juil. 09	389,3	39,6	145,5	45,3	89,4	6,4
	Sep. 09	334,0	42,3	125,0	17,0	160,4	50,9
	Oct. 09	234,8	20,1	99,2	14,2	125,2	24,2
	Dec. 09	259,8	18,8	169,5	7,2	198,1	32,2
	Jan. 10	201,9	42,0	160,3	37,6	202,1	41,1
	Mar. 10	337,6	43,6	154,1	27,5	203,9	37,0
Lt	Mai 09	324,7	83,6	143,1	23,0	144,5	18,6
	Juil. 09	391,9	34,1	212,9	23,6	130,2	31,9
	Sep. 09	398,8	44,7	200,9	21,6	198,7	15,1
	Oct. 09	349,6	78,5	239,1	53,0	330,7	64,8
	Dec. 09	339,3	38,4	284,7	45,1	246,8	49,4
	Jan. 10	585,7	37,7	463,8	67,8	361,2	22,1
	Mar. 10	673,8	125,5	208,5	31,3	316,1	49,9
Ey	Mai 09	335,9	67,9	112,9	19,3	144,0	9,5
	Juil. 09	319,7	85,1	172,7	72,4	119,5	21,0
	Sep. 09	497,3	63,1	262,6	40,2	360,5	44,7
	Oct. 09	872,7	101,5	643,5	132,4	530,7	42,7
	Dec. 09	627,4	333,9	288,5	26,4	344,3	55,4
	Jan. 10	623,9	111,8	779,0	146,0	592,5	75,1
	Mar. 10						

Concentrations en zinc ASCOBAR 2		Zn branchies (µg/g, ps)		Zn glande digestive (µg/g, ps)		Zn restes (µg/g, ps)	
		Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard
Ar	Mai 09	3895,1	1741,1	1111,3	227,1	1816,2	295,3
	Juil. 09	3958,6	833,8	3739,5	683,1	1724,3	239,9
	Sep. 09	3559,1	212,6	2712,1	494,9	3854,8	646,9
	Oct. 09	1619,4	339,6	2548,3	1494,2	1699,4	258,0
	Dec. 09	2323,1	214,9	2038,3	145,5	1855,7	181,3
	Jan. 10	2406,6	327,2	1556,4	176,1	1176,5	302,2
	Mar. 10	3256,5	523,1	1114,5	157,6	1754,3	310,3
Bé	Mai 09	1371,3	307,6	842,8	139,1	1167,8	84,8
	Juil. 09	4542,8	504,9	1842,7	300,8	1824,4	148,6
	Sep. 09	3631,4	703,6	2080,1	305,6	2803,6	613,4
	Oct. 09	2692,4	369,7	1323,3	211,5	1650,0	198,1
	Dec. 09	3606,1	879,6	1093,1	267,2	1631,2	365,6
	Jan. 10	2963,0	450,2	2608,2	370,0	2317,6	298,0
	Mar. 10	3793,0	539,9	1119,7	173,8	2391,6	256,6
Gb	Mai 09	2457,3	348,7	1257,3	158,6	1527,9	268,1
	Juil. 09	4735,6	863,6	2463,3	537,5	1720,4	248,5
	Sep. 09	3354,6	263,0	2034,1	261,1	1996,7	241,0
	Oct. 09	1968,8	328,9	1096,7	247,8	1450,6	167,7
	Dec. 09	2445,5	229,4	1314,8	94,2	1148,2	99,8
	Jan. 10	3295,2	343,5	1929,1	192,9	1525,1	355,8
	Mar. 10	3355,1	192,2	1078,6	165,3	1515,7	114,5
Io	Mai 09	2959,3	506,2	1264,4	189,0	1516,8	195,4
	Juil. 09	6395,5	914,1	2201,3	705,7	1247,6	127,7
	Sep. 09	4410,6	636,4	1842,3	246,9	1897,6	352,6
	Oct. 09	2671,1	233,1	1240,7	230,4	1628,2	109,6
	Dec. 09	4214,9	649,5	2315,5	227,4	2713,9	302,7
	Jan. 10	2586,7	471,6	2080,4	507,8	2640,9	377,0
	Mar. 10	4244,5	553,0	1715,4	312,6	2184,4	218,8
Lt	Mai 09	4093,1	951,0	1998,7	206,5	2295,0	257,1
	Juil. 09	4697,1	368,7	2721,0	219,0	1680,3	405,7
	Sep. 09	4683,1	368,2	2355,0	302,8	2470,8	131,4
	Oct. 09	4133,7	1477,6	2028,5	428,6	3750,6	709,3
	Dec. 09	3373,1	353,6	2671,0	514,8	2190,5	338,2
	Jan. 10	5822,0	491,6	4397,2	681,0	3638,2	287,7
	Mar. 10	5756,9	748,6	1924,7	269,0	3061,7	291,5
Ey	Mai 09	3254,3	454,0	1406,6	260,9	1840,8	160,1
	Juil. 09	2081,3	477,2	1583,9	433,1	798,7	150,2
	Sep. 09	2924,7	379,6	1875,0	255,3	2264,4	294,5
	Oct. 09	3595,5	274,6	2706,4	714,8	2358,1	461,5
	Dec. 09	3720,7	914,1	2552,9	382,9	1988,1	318,5
	Jan. 10	3459,9	286,5	4295,8	764,2	3571,4	664,5
	Mar. 10						

Concentrations en cadmium ASCOBAR 2		Cd branchies ($\mu\text{g/g}$, ps)		Cd glande digestive ($\mu\text{g/g}$, ps)		Cd restes ($\mu\text{g/g}$, ps)	
		Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard
Ar	Mai 09	1,2	0,2	1,5	0,3	0,7	0,1
	Juil. 09	3,4	1,4	5,2	1,2	1,7	0,4
	Sep. 09	1,3	0,1	3,2	0,2	0,9	0,0
	Oct. 09	1,6	0,2	2,7	0,1	0,7	0,1
	Dec. 09	1,5	0,1	3,4	0,2	0,9	0,0
	Jan. 10	1,7	0,1	2,7	0,2	0,9	0,1
	Mar. 10						
Bé	Mai 09	1,4	0,2	1,7	0,1	1,0	0,1
	Juil. 09	1,7	0,1	2,6	0,2	0,6	0,0
	Sep. 09	1,7	0,1	2,5	0,1	1,0	0,0
	Oct. 09	1,2	0,1	2,4	0,2	0,9	0,1
	Dec. 09	1,5	0,1	3,0	0,1	1,0	0,1
	Jan. 10	1,8	0,3	3,3	0,2	1,4	0,2
	Mar. 10						
Gb	Mai 09	1,0	0,6	1,1	0,5	0,4	0,2
	Juil. 09	1,8	0,1	3,1	0,2	1,0	0,1
	Sep. 09	1,3	0,1	2,5	0,2	0,9	0,1
	Oct. 09	1,2	0,1	2,0	0,5	0,6	0,0
	Dec. 09	1,3	0,1	2,4	0,1	0,7	0,1
	Jan. 10	1,8	0,1	2,9	0,4	0,9	0,1
	Mar. 10						
Io	Mai 09	1,8	0,1	2,8	0,3	1,1	0,1
	Juil. 09	1,4	0,1	1,1	0,1	0,6	0,1
	Sep. 09	1,3	0,1	1,7	0,1	0,8	0,1
	Oct. 09	1,1	0,1	1,6	0,1	0,7	0,0
	Dec. 09	1,7	0,1	2,2	0,4	1,1	0,2
	Jan. 10	1,4	0,1	1,7	0,2	0,9	0,0
	Mar. 10						
Lt	Mai 09	2,5	0,3	2,3	0,2	1,3	0,0
	Juil. 09	2,1	0,1	2,0	0,5	1,0	0,1
	Sep. 09	2,1	0,2	2,9	0,3	1,1	0,1
	Oct. 09	1,5	0,1	2,2	0,2	1,0	0,1
	Dec. 09	1,7	0,1	2,0	0,2	0,9	0,1
	Jan. 10	1,6	0,1	1,8	0,0	1,1	0,0
	Mar. 10						
Ey	Mai 09	2,3	0,3	2,1	0,4	1,3	0,1
	Juil. 09	1,6	0,1	1,2	0,1	0,6	0,0
	Sep. 09	1,8	0,2	2,5	0,4	1,0	0,1
	Oct. 09	1,5	0,1	2,1	0,2	0,8	0,1
	Dec. 09	1,8	0,1	2,4	0,3	1,1	0,1
	Jan. 10	2,0	0,2	2,6	0,2	1,3	0,1
	Mar. 10						

Concentrations en cuivre OSQUAR 1		Cu branchies ($\mu\text{g/g}$, ps)		Cu glande digestive ($\mu\text{g/g}$, ps)		Cu restes ($\mu\text{g/g}$, ps)	
		Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard
Ar	Juil. 10	196,6	34,6	101,5	13,2	61,7	5,8
	Oct. 10						
	Fév. 11	115,5	15,9	66,2	4,0	61,1	6,0
Bé	Juil. 10	234,9	20,5	166,7	11,8	96,1	9,4
	Oct. 10	277,6	18,0	183,2	21,0	200,8	28,2
	Fév. 11	169,7	8,2	104,3	10,8	175,3	25,0
Gb	Juil. 10	196,1	45,9	114,3	17,1	63,6	6,9
	Oct. 10	198,4	26,2	137,1	29,4	112,8	22,1
	Fév. 11						
Io	Juil. 10	235,8	23,5	152,4	24,0	92,3	9,2
	Oct. 10	237,2	45,4	104,1	10,6	109,2	16,0
	Fév. 11	184,4	27,1	121,3	35,7	150,7	29,6
Lt	Juil. 10	263,6	65,1	246,2	43,5	97,1	19,1
	Oct. 10	334,5	41,4	238,9	43,5	256,0	47,1
	Fév. 11	288,1	42,1	183,2	11,4	206,7	40,3
Ey	Juil. 10	518,1	56,9	256,6	8,3	199,9	25,9
	Oct. 10	520,9	76,8	157,3	22,7	254,7	36,5
	Fév. 11	493,0	88,4	255,1	50,2	167,5	21,9

Concentrations en zinc OSQUAR 1		Zn branchies ($\mu\text{g/g}$, ps)		Zn glande digestive ($\mu\text{g/g}$, ps)		Zn restes ($\mu\text{g/g}$, ps)	
		Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard
Ar	Juil. 10	3048	421	1321	211	973	77
	Oct. 10						
	Fév. 11	1967	281	1076	52	1079	107
Bé	Juil. 10	3547	217	2366	223	1373	174
	Oct. 10	3298	228	2137	181	1869	205
	Fév. 11	3908	664	2270	388	2901	314
Gb	Juil. 10	3064	713	1374	356	1068	75
	Oct. 10	3238	245	1526	278	1564	244
	Fév. 11						
Io	Juil. 10	2998	205	2075	274	1163	162
	Oct. 10	2489	843	991	128	1260	163
	Fév. 11	2206	336	1313	292	1566	321
Lt	Juil. 10	3284	785	2276	424	1172	208
	Oct. 10	3669	237	2437	327	2359	349
	Fév. 11	3224	434	2179	324	2237	192
Ey	Juil. 10	4718	565	2462	290	1536	250
	Oct. 10	3151	529	1249	128	1524	164
	Fév. 11	3055	205	1911	290	2166	292

Concentrations en cadmium OSQUAR 1		Cd branchies ($\mu\text{g/g}$, ps)		Cd glande digestive ($\mu\text{g/g}$, ps)		Cd restes ($\mu\text{g/g}$, ps)	
		Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard
Ar	Juil. 10	1,7	0,3	5,0	0,4	0,8	0,1
	Oct. 10						
	Fév. 11	2,0	0,1	2,8	0,3	0,9	0,0
Bé	Juil. 10	2,2	0,1	3,9	0,3	0,9	0,1
	Oct. 10	1,5	0,1	3,2	0,5	1,3	0,3
	Fév. 11	2,1	0,3	2,7	0,2	1,1	0,1
Gb	Juil. 10	2,3	0,2	3,9	0,4	0,9	0,1
	Oct. 10	1,7	0,2	3,3	0,3	1,2	0,1
	Fév. 11						
Io	Juil. 10	2,0	0,3	2,3	0,2	0,7	0,1
	Oct. 10	1,4	0,3	1,9	0,3	1,0	0,2
	Fév. 11	2,0	0,2	1,7	0,3	0,9	0,1
Lt	Juil. 10	2,8	0,3	3,1	0,5	0,9	0,1
	Oct. 10	1,2	0,1	1,6	0,1	1,1	0,0
	Fév. 11	2,9	0,3	2,2	0,3	1,5	0,3
Ey	Juil. 10	2,4	0,2	2,4	0,2	0,9	0,1
	Oct. 10	1,4	0,0	1,7	0,2	0,8	0,0
	Fév. 11	2,4	0,2	1,4	0,1	0,9	0,1

Concentrations en cuivre OSQUAR 2		Cu branchies (µg/g, ps)		Cu glande digestive (µg/g, ps)		Cu restes (µg/g, ps)	
		Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard
Ar	Juil. 11	119,9	19,7	91,3	12,3	54,8	9,0
	Oct. 11	117,6	15,6	63,0	15,4	41,6	7,4
	Jan. 12	145,5	49,2	71,8	27,5	80,8	10,2
	Mai 12	143,0	12,9	62,6	8,9	61,5	6,9
	Sep. 12	152,9	13,2	138,5	21,1	45,2	6,7
Bé	Juil. 11	256,2	32,0	136,8	16,9	78,3	15,6
	Oct. 11	186,2	35,0	93,5	12,1	67,2	14,9
	Jan. 12	218,6	85,8	166,6	33,7	102,9	25,4
	Mai 12	207,7	33,7	111,1	9,6	115,1	16,8
	Sep. 12	279,4	25,9	158,4	23,5	173,7	13,3
Gb	Juil. 11	150,8	29,0	148,9	17,0	65,1	7,3
	Oct. 11	158,1	31,4	107,4	18,4	78,6	13,9
	Jan. 12	297,9	34,4	235,8	69,3	172,9	30,6
	Mai 12	218,2	18,8	94,3	9,2	111,9	7,2
	Sep. 12	591,3	170,9	352,3	112,1	185,6	28,1
Io	Juil. 11	208,3	25,8	192,6	45,8	149,2	18,7
	Oct. 11	274,8	56,9	147,9	24,4	136,8	11,9
	Jan. 12	300,4	85,6	274,1	63,8	117,0	22,3
	Mai 12	246,3	34,8	103,5	17,7	115,8	18,3
	Sep. 12	375,3	29,0	197,8	27,6	165,5	26,3
Lt	Juil. 11	313,9	40,4	563,2	350,5	207,3	18,0
	Oct. 11	330,0	34,2	294,8	45,2	221,6	30,2
	Jan. 12	485,8	131,3	294,2	43,6	153,2	22,6
	Mai 12	369,9	27,0	171,6	22,2	166,5	25,5
	Sep. 12						
Ey	Juil. 11	850,9	74,5	388,8	36,0	328,5	78,1
	Oct. 11	911,8	120,6	530,0	102,5	420,5	50,0
	Jan. 12	714,9	110,7	713,5	305,7	408,1	66,6
	Mai 12	683,6	30,5	256,5	50,6	305,4	24,0
	Sep. 12						

Concentrations en zinc OSQUAR 2		Zn branchies ($\mu\text{g/g}$, ps)		Zn glande digestive ($\mu\text{g/g}$, ps)		Zn restes ($\mu\text{g/g}$, ps)	
		Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard
Ar	Juil. 11	2490	369	1813	428	719	198
	Oct. 11	1649	123	1108	295	783	181
	Jan. 12	2024	564	1010	293	1526	
	Mai 12	2699	293	1281	230	1097	148
	Sep. 12	2604	228	2205	376	621	91
Bé	Juil. 11	2740	101	1697	292	718	106
	Oct. 11	2242	350	1262	130	892	184
	Jan. 12	2300	757	1854	547	1104	312
	Mai 12	3270	664	1721	218	1733	261
	Sep. 12	3299	118	1805	139	1902	95
Gb	Juil. 11	2334	379	2309	154	944	144
	Oct. 11	2440	386	1559	200	1124	250
	Jan. 12	5242	1801	2431	668		
	Mai 12	3225	295	1342	200	1541	127
	Sep. 12	9027	2890	5037	1727	2579	416
Io	Juil. 11	2225	288	1983	523	1550	266
	Oct. 11	2966	717	1812	492	1333	172
	Jan. 12	3089	912	2836	771	1219	270
	Mai 12	3096	453	1425	268	1476	267
	Sep. 12	4843	408	2617	187	2035	277
Lt	Juil. 11	2567	327	5272	3355	1822	135
	Oct. 11	2604	311	2386	399	1529	305
	Jan. 12	4014	901	2268	346	1307	203
	Mai 12	4139	322	2147	306	1897	342
	Sep. 12						
Ey	Juil. 11	3848	371	2390	203	1846	461
	Oct. 11	2639	252	1882	367	1334	106
	Jan. 12	2464	607	2531	1121	1363	361
	Mai 12	3315	38	1342	249	1470	92
	Sep. 12						

Concentrations en cadmium OSQUAR 2		Cd branchies (µg/g, ps)		Cd glande digestive (µg/g, ps)		Cd restes (µg/g, ps)	
		Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard	Moyenne	Erreur standard
Ar	Juil. 11	2,4	0,3	7,1	1,4	1,0	0,1
	Oct. 11	1,5	0,1	2,5	0,1	0,7	0,2
	Jan. 12	1,7	0,6	2,2	0,6	1,0	0,2
	Mai 12	4,1	0,5	5,8	0,9	1,3	0,2
	Sep. 12	2,6	0,2	6,1	0,9	0,5	0,1
Bé	Juil. 11	2,4	0,4	3,7	0,6	0,7	0,1
	Oct. 11	1,3	0,1	1,9	0,2	0,6	0,1
	Jan. 12	1,7	0,5	2,8	0,7	0,8	0,2
	Mai 12	5,1	0,6	5,7	0,5	1,5	0,0
	Sep. 12	2,8	0,3	6,2	1,3	1,4	0,1
Gb	Juil. 11	2,3	0,4	6,0	1,7	0,8	0,1
	Oct. 11	1,9	0,1	3,5	0,4	1,0	0,0
	Jan. 12	4,4	1,2	5,0	0,9	1,3	0,2
	Mai 12	6,4	0,7	7,7	1,3	2,0	0,2
	Sep. 12	7,2	3,0	12,1	3,1	2,0	0,3
Io	Juil. 11	1,3	0,1	1,6	0,3	0,9	0,1
	Oct. 11	1,4	0,2	1,9	0,1	1,0	0,1
	Jan. 12	2,1	0,5	2,7	0,7	0,8	0,1
	Mai 12	2,9	0,4	2,6	0,2	1,1	0,1
	Sep. 12	3,2	0,3	4,9	0,3	1,2	0,2
Lt	Juil. 11	1,6	0,3	3,8	2,2	1,2	0,1
	Oct. 11	1,9	0,2	2,2	0,2	1,1	0,1
	Jan. 12	3,6	1,0	2,8	0,4	1,1	0,2
	Mai 12	4,9	0,7	3,3	0,3	1,3	0,2
	Sep. 12						
Ey	Juil. 11	1,6	0,1	2,4	0,2	1,0	0,2
	Oct. 11	1,5	0,1	1,9	0,2	0,8	0,0
	Jan. 12	1,6	0,2	2,4	0,6	0,9	0,1
	Mai 12	4,5	0,8	3,2	0,2	1,2	0,1
	Sep. 12						

6. Données « MTs » du suivi *in-situ*

Concentrations en MTs ASCOBAR 2		Branchies (nmol Hg/g, pf)		Glande digestive (nmol Hg/g, pf)		Restes (nmol Hg/g, pf)	
		Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Ar	Mai 09	6,6	4,2	29,4	3,1	13,4	3,1
	Juil. 09	9,5	4,3	50,6	4,9	15,1	4,9
	Sep. 09	11,6	6,9	49,1	5,7	15,3	5,7
	Oct. 09	9,3	4,1	35,9	3,3	13,8	3,3
	Dec. 09	16,9	6,6	76,0	16,1	23,9	16,1
	Jan. 10	16,4	6,2	54,6	5,9	21,1	5,9
	Mar. 10	12,2	6,1	35,2	6,6	14,2	6,6
Be	Mai 09	5,7	3,7	28,5	3,4	13,5	3,4
	Juil. 09	19,0	7,8	47,1	10,0	27,2	10,0
	Sep. 09	28,2	5,3	68,1	7,9	19,9	7,9
	Oct. 09	15,4	4,2	38,5	3,9	15,0	3,9
	Dec. 09	21,7	9,8	53,5	5,9	19,5	5,9
	Jan. 10	8,9	5,1	46,3	5,1	15,4	5,1
	Mar. 10	18,3	8,0	27,6	4,9	20,6	4,9
Gb	Mai 09	1,5	0,5	25,4	3,0	11,5	3,0
	Juil. 09	7,3	2,8	37,7	5,0	14,2	5,0
	Sep. 09	10,9	4,8	37,9	5,1	11,7	5,1
	Oct. 09	16,2	5,0	37,4	3,1	15,0	3,1
	Dec. 09	28,7	5,9	42,5	5,0	17,7	5,0
	Jan. 10	10,6	5,3	52,5	11,9	19,5	11,9
	Mar. 10	11,7	6,8	42,1	2,8	13,2	2,8
Io	Mai 09	4,4	3,1	24,1	3,8	10,6	3,8
	Juil. 09	10,3	3,4	33,1	2,0	11,5	2,0
	Sep. 09	13,8	4,2	29,8	3,3	13,6	3,3
	Oct. 09	11,7	5,4	45,0	5,6	11,3	5,6
	Dec. 09	23,9	14,1	49,2	4,7	17,1	4,7
	Jan. 10	16,7	7,5	58,5	2,0	17,4	2,0
	Mar. 10	16,2	5,1	37,7	7,0	21,8	7,0
Lt	Mai 09	5,1	1,6	24,2	3,6	13,4	3,6
	Juil. 09	9,1	2,9	31,7	7,3	18,6	7,3
	Sep. 09	19,7	2,2	51,2	4,3	14,2	4,3
	Oct. 09	28,9	9,3	60,8	2,6	21,6	2,6
	Dec. 09	22,5	4,3	46,3	5,7	22,8	5,7
	Jan. 10	17,0	3,8	61,6	13,0	26,4	13,0
	Mar. 10	25,0	9,8	54,0	1,7	27,7	1,7
Ey	Mai 09	5,3	2,5	33,8	4,2	11,5	4,2
	Juil. 09	14,4	5,1	43,1	10,4	22,3	10,4
	Sep. 09	31,8	7,0	66,6	4,5	19,6	4,5
	Oct. 09	19,0	4,9	56,1	5,4	14,4	5,4
	Dec. 09	16,0	6,3	49,1	8,6	17,0	8,6
	Jan. 10	25,2	3,7	66,1	7,3	20,6	7,3
	Mar. 10						

Concentrations en MTs OSQUAR 1		Branchies (nmol Hg/g, pf)		Glande digestive (nmol Hg/g, pf)		Restes (nmol Hg/g, pf)	
		Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Ar	Juil. 10	4,8	3,3	44,2	6,6	10,0	3,0
	Oct. 10						
	Fév. 11	4,8	2,4	35,7	3,8	10,7	6,6
Bé	Juil. 10	8,6	7,2	47,7	7,0	16,2	7,9
	Oct. 10	8,3	6,1	39,1	7,9	13,1	8,0
	Fév. 11	8,3	4,2	43,3	5,7	10,8	5,7
Gb	Juil. 10	7,7	3,6	49,3	8,6	16,8	5,0
	Oct. 10	5,2	3,6	39,6	7,5	11,6	7,2
	Fév. 11						
Io	Juil. 10	5,9	3,5	39,9	6,7	12,0	6,0
	Oct. 10	6,7	4,1	32,2	6,2	11,3	7,1
	Fév. 11	10,9	4,5	39,1	6,5	16,7	8,2
Lt	Juil. 10	6,7	3,0	43,2	9,4	14,0	4,4
	Oct. 10	17,4	12,2	54,0	27,9	12,7	8,6
	Fév. 11	10,5	10,0	45,4	9,5	20,2	6,9
Ey	Juil. 10	8,6	4,3	49,6	5,2	22,3	8,8
	Oct. 10	14,9	7,8	49,9	14,2	19,6	13,5
	Fév. 11	18,7	5,4	52,3	7,6	14,2	4,9

7. Données « Génétique » du suivi *in-situ*

Expressions géniques relatives Branches ASCOBAR 2	gpx		gst		mxr		sod		cyltal		cost		mtl		mt2		sodmt		
	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	
mai-09	Ar	0,06	0,02	0,12	0,06	6,70E-04	2,50E-04	2,70E-02	1,50E-02	1,44	0,57	28	9	0,68	0,21	0,6	0,3	5,10E-02	1,60E-02
	Bé	0,09	0,02	0,06	0,02	1,20E-03	4,60E-04	2,20E-02	1,30E-02	0,1	0,03	14	3	1,81	1,09	0,7	0,5	3,20E-02	1,00E-02
	Gb	0,01	0	0,98	0,47	9,60E-04	3,70E-04	1,00E-02	7,30E-03	0,14	0,06	48	11	33,93	7,54	78,7	21,2	1,90E-02	4,30E-03
	IO	0,15	0,02	0,12	0,04	5,00E-04	3,20E-04	1,60E-04	9,50E-05	0,25	0,04	34	7	1,93	1,38	2,7	2,2	1,10E-01	4,00E-02
Juil. 09	Lt	0,06	0,01	0,07	0,02	1,40E-03	2,70E-04	1,10E-01	4,20E-02	0,14	0,04	37	17	2,79	2,21	3,2	2,4	8,10E-02	4,30E-03
	Ey	0,17	0,06	0,15	0,06	9,10E-05	4,80E-05	2,40E-02	9,60E-03	0,56	0,12	36	12	0,92	0,24	0,7	0,2	8,70E-02	3,10E-02
	Ar	0,15	0,04	0,04	0,01	1,40E-03	4,50E-04	1,40E-02	8,90E-04	0,45	0,12	22	5	1,22	0,28	1	0,3	1,30E-01	6,10E-02
	Bé	0,28	0,06	0,03	0,01	2,00E-04	1,30E-04	2,60E-03	2,00E-03	0,58	0,21	19	3	1,26	0,55	0,4	0,1	5,50E-02	2,10E-02
Sep. 09	Gb	0,15	0,03	0,04	0,01	4,80E-04	1,80E-04	5,00E-05	2,20E-05	0,46	0,2	25	5	1,59	0,29	1,2	0,2	3,10E-01	2,80E-01
	IO	0,19	0,06	0,37	0,11	1,30E-03	5,50E-04	5,10E-02	6,10E-03	0,16	0,03	45	15	5,16	1,99	9	3,9	7,50E-02	2,60E-02
	Lt	0,11	0,06	0,03	0,01	9,60E-04	3,80E-04	2,30E-04	1,40E-04	0,12	0,04	14	5	0,39	0,15	1	0,6	1,20E-01	6,10E-02
	Ey	0,27	0,1	0,06	0,03	2,60E-03	1,80E-03	7,90E-03	3,30E-03	0,39	0,11	27	7	0,9	0,13	0,9	0,2	1,80E-01	7,40E-02
Oct. 09	Ar	0,39	0,08	0,06	0,01	8,50E-04	4,60E-04	3,60E-02	1,50E-02	0,5	0,13	34	9	0,61	0,18	0,6	0,1	2,20E-01	8,20E-02
	Bé	0,35	0,11	0,36	0,12	4,60E-04	3,40E-04	1,50E-01	1,10E-01	0,15	0,06	201	81	0,2	0,05	2,8	1,4	1,20E-01	3,20E-02
	Gb	0,85	0,28	0,43	0,19	1,90E-04	8,50E-05	2,00E-02	1,10E-02	0,55	0,16	17	8	0,12	0,03	0,7	0,3	6,90E-02	2,80E-02
	IO	0,52	0,15	0,18	0,05	3,30E-04	1,70E-04	2,60E-02	2,10E-02	0,33	0,05	30	9	0,52	0,11	0,5	0,1	5,20E-02	6,70E-03
Dec. 09	Lt	0,14	0,03	0,25	0,08	7,90E-02	3,10E-02	2,70E-02	7,10E-03	0,12	0,03	10	3	2,85	1,85	1,2	0,6	1,30E-01	4,80E-02
	Ey	0,22	0,03	0,21	0,05	3,80E-03	1,50E-03	2,40E-02	1,80E-02	0,26	0,03	46	17	0,12	0,06	4,4	2,7	9,00E-02	2,90E-02
	Ar	0,47	0,11	0,41	0,14	2,10E-01	8,50E-02	2,00E-01	1,10E-01	0,3	0,12	38	25	0,5	0,16	21	9,3	3,20E-01	9,60E-02
	Bé	0,32	0,08	0,2	0,08	6,10E-03	4,30E-03	6,60E-02	2,10E-02	0,3	0,1	70	20	1,19	0,46	1,3	0,3	2,60E-01	4,40E-02
Jan. 10	Gb	0,43	0,17	0,52	0,31	4,90E-03	6,90E-04	3,70E-04	2,00E-04	0,1	0,04	69	24	1,47	0,46	1,3	0,3	4,80E-01	2,40E-01
	IO	0,21	0,09	0,64	0,31	1,00E-01	4,40E-02	5,40E-01	2,70E-01	0,97	0,38	164	80	2,73	1,61	4,6	2,4	8,10E-01	2,60E-01
	Lt	0,45	0,11	0,15	0,06	1,10E-03	3,50E-04	4,50E-02	3,10E-02	0,36	0,15	25	10	1,08	0,36	0,9	0,4	3,40E-01	1,30E-01
	Ey	0,18	0,07	0,04	0,01	2,50E-04	6,30E-05	7,20E-02	2,90E-02	0,15	0,02	19	5	0,77	0,2	1	0,3	1,50E-01	5,90E-02
Jan. 10	Ar	0,31	0,06	0,23	0,05	3,50E-02	1,50E-02	4,10E-02	1,80E-02	0,39	0,17	97	62	2,9	1,05	3,5	1,3	4,00E-01	9,60E-02
	Bé	0,46	0,08	0,39	0,12	1,70E-01	9,80E-02	1,40E+00	8,60E-01	1,3	0,7	208	114	2,92	0,78	5,6	3,2	5,20E-01	1,70E-01
	Gb	0,54	0,18	0,33	0,14	1,40E-02	7,00E-03	1,90E-01	6,10E-02	0,38	0,12	80	39	2,04	0,95	2,1	0,6	4,90E-01	1,10E-01
	IO	0,56	0,23	0,27	0,11	6,50E-02	5,30E-02	9,20E-02	3,50E-02	0,65	0,42	86	55	2,91	1,26	11,6	9,9	4,50E-01	2,00E-01
Jan. 10	Lt	0,46	0,14	0,1	0,05	8,90E-02	6,00E-02	1,60E-01	5,20E-02	0,22	0,1	37	13	1,13	0,22	1,2	0,2	1,80E-01	4,70E-02
	Ey	0,46	0,21	0,46	0,3	5,20E-03	2,90E-03	1,20E-01	5,90E-02	1,34	0,56	114	56	32,43	28,24	87,8	76,4	9,50E-01	1,50E-01
	Ar	0,12	0,01	0,35	0,11	2,30E-03	5,30E-04	4,70E-05	2,50E-05	0,44	0,07	13	4	0,78	0,12	1	0,2	3,30E-01	1,50E-01
	Bé	0,11	0,04	0,1	0,05	3,70E-03	9,70E-04	1,80E-01	9,40E-02	0,23	0,02	18	5	0,77	0,09	0,8	0,1	1,70E-01	4,30E-02
Jan. 10	Gb	0,28	0,08	0,28	0,12	1,40E-01	7,70E-02	9,00E-02	5,60E-02	0,35	0,09	17	6	2,48	1,2	1,3	0,2	5,40E-01	1,30E-01
	IO	0,6	0,23	0,42	0,12	7,90E-01	4,50E-01	4,00E-01	2,10E-01	1,29	0,56	30	15	4,21	1,35	4,3	1,3	1,10E+00	4,50E-01
	Lt	0,13	0,03	0,09	0,02	8,10E-03	4,20E-03	1,10E-03	6,50E-04	0,19	0,02	19	3	2,17	0,8	2,7	1,3	1,90E-01	2,10E-02
	Ey	0,46	0,3	1,37	0,78	1,30E+00	8,60E-01	3,50E-02	1,80E-02	0,5	0,35	23	6	35,66	17,77	185,8	133,8	7,20E-01	4,10E-01

Expressions génétiques relatives Glande digestive ASCOBAR 2	gpx		gst		mxr		sod		cplal		cost		mtl		ml2		sodmt		
	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	
mai-09	Ar	0,09	0,01	3,1	1,58	2,20E-02	1,30E-02	4,30E-01	2,90E-01	3,07	0,26	161	57	13,94	5,88	14,1	6,6	2,10E-01	9,50E-02
	Bé	0,13	0,01	0,4	0,25	3,30E-04	1,30E-04	6,30E-02	2,80E-02	0,61	0,32	103	31	10,3	1,62	9,7	4,3	5,20E-02	2,10E-02
	Gb	0	0	0,31	0,2	2,60E-04	5,30E-05	8,00E-04	5,80E-04	0,43	0,26	118	35	1,76	0,32	7,2	1,8	6,00E-02	3,30E-02
	IO	0,24	0,06	1,91	1,48	1,10E-05	5,70E-06	1,20E-05	1,10E-05	0,46	0,09	51	16	43,9	37,77	9,6	0,5	2,50E-02	7,20E-03
	Lt	0,09	0,02	0,48	0,19	3,50E-05	9,70E-06	8,80E-02	2,60E-02	0,47	0,13	47	2	6,58	2,22	10,9	6,6	1,00E-01	3,00E-02
	Ey	0,01	0	2	1,31	1,10E-05	4,90E-06	2,00E-01	9,40E-02	0,54	0,27	87	37	19,11	7,31	85,4	28,4	1,70E-01	1,10E-01
Juil. 09	Ar	0,27	0,05	0,58	0,2	2,00E-04	1,60E-04	3,00E-02	7,60E-03	0,74	0,27	40	7	5,96	2,39	12,4	4,8	4,50E-02	2,10E-02
	Bé	0,17	0,07	0,24	0,11	9,00E-05	3,90E-05	5,10E-03	2,80E-03	0,87	0,27	42	12	1,76	0,36	1,8	0,4	7,50E-02	3,30E-02
	Gb	0,35	0,1	8,85	3,94	3,70E-04	1,50E-04	1,80E-04	1,50E-04	0,06	0,02	159	23	4,83	3,03	4,6	2,3	4,70E-02	1,70E-02
	IO	0,23	0,1	0,38	0,17	5,20E-05	8,60E-06	1,10E-01	5,80E-02	0,05	0,03	90	41	1,49	0,67	1,1	0,4	6,30E-02	3,70E-02
	Lt	0,2	0,03	0,16	0,05	3,20E-05	1,90E-05	4,50E-03	2,40E-03	0,51	0,13	68	18	10,07	7,54	19,2	15,4	7,50E-02	4,50E-02
	Ey	0,15	0,07	0,15	0,06	4,50E-05	3,50E-05	1,40E-03	5,50E-04	0,42	0,1	24	8	0,34	0,13	8,3	4,6	1,10E-02	6,00E-03
Sep. 09	Ar	0,19	0,02	0,29	0,15	3,90E-06	2,10E-06	5,00E-02	2,50E-02	0,73	0,19	48	17	4,68	1,09	9,4	3,5	1,70E-01	8,70E-02
	Bé	0,27	0,12	0,62	0,12	1,80E-05	1,40E-05	1,50E-01	1,10E-01	0,88	0,28	89	22	7,99	3,22	14,2	4,2	1,10E-01	3,10E-02
	Gb	0,5	0,07	0,72	0,25	1,60E-04	1,50E-04	1,10E-01	5,70E-02	0,79	0,14	83	10	9,86	2,44	25,4	7,8	6,10E-02	2,10E-02
	IO	0,19	0,04	1,31	0,74	8,80E-05	2,90E-05	1,20E-04	1,10E-04	0,92	0,28	46	9	11,03	6,84	18,5	12,1	1,20E-01	3,70E-02
	Lt	0,07	0,02	0,1	0,03	4,20E-05	3,60E-05	8,80E-03	1,10E-03	0,13	0,02	21	4	1,02	0,38	0,6	0,2	3,90E-02	1,10E-02
	Ey	0,09	0,02	0,3	0,13	4,90E-05	3,50E-06	3,80E-02	1,80E-02	0,39	0,13	72	38	4,16	2,56	6	1	1,30E-02	5,80E-03
Oct. 09	Ar	0,17	0,05	4,69	2,98	1,50E-03	2,60E-04	1,40E-01	9,70E-02	0,56	0,29	111	35	11,32	5,83	99,1	41,8	1,00E-01	3,20E-02
	Bé	0,16	0,04	2,78	1,24	2,30E-04	1,10E-04	9,10E-02	4,10E-02	1,06	0,23	150	33	39,28	12,1	108,2	43,7	2,70E-01	5,80E-02
	Gb	0,17	0,03	0,45	0,13	1,40E-04	3,80E-05	4,30E-05	2,20E-05	0,05	0,02	48	14	3,52	0,96	4,9	1,2	1,60E-01	2,60E-02
	IO	0,14	0,04	0,51	0,24	4,30E-03	2,60E-03	3,30E-01	1,80E-01	0,83	0,37	133	64	4,05	0,18	6,1	0,8	2,90E-01	5,40E-02
	Lt	0,23	0,04	0,38	0,07	2,90E-03	2,50E-03	9,00E-02	5,60E-02	0,36	0,06	83	12	3,67	0,63	6	1,5	2,20E-01	2,80E-02
	Ey	0,17	0,04	0,7	0,27	1,60E-02	1,40E-02	1,90E-01	1,30E-01	0,2	0,04	65	11	10,08	2,82	31,1	14,5	2,70E-01	4,60E-02
Dec. 09	Ar	0,26	0,1	0,24	0,05	3,90E-04	1,70E-04	2,50E-04	1,60E-04	0,42	0,18	113	39	9,54	1,57	14,9	3	2,40E-01	8,00E-02
	Bé	0,23	0,11	0,48	0,19	1,20E-02	5,30E-03	7,10E-01	5,90E-01	0,13	0,08	232	110	49,92	30	193,8	127	5,60E-01	2,00E-01
	Gb	0,51	0,15	0,26	0,08	9,60E-04	7,50E-04	5,20E-01	4,30E-01	0,33	0,09	153	61	6,36	3,19	8,5	4,1	2,90E-01	6,10E-02
	IO	0,23	0,05	0,53	0,29	6,00E-03	3,60E-03	1,70E-02	3,40E-03	0,19	0,06	50	20	4,85	3,06	4,8	3,2	1,50E-01	4,20E-02
	Lt	0,27	0,06	0,44	0,24	4,70E-03	4,30E-03	9,70E-02	5,60E-02	0,21	0,09	96	19	19,27	12,22	26,3	16,8	1,90E-01	2,60E-02
	Ey	0,15	0,04	0,36	0,15	1,10E-03	6,70E-04	8,10E-02	4,20E-02	0,41	0,26	180	80	21,99	12,83	14,1	7,6	3,10E-01	1,50E-01
Jan. 10	Ar	0,33	0,13	0,71	0,16	1,40E-01	6,40E-02	1,40E-00	7,40E-01	0,42	0,16	101	44	4,19	2,25	7,7	4,9	6,60E-01	1,60E-01
	Bé	0,08	0,02	0,22	0,02	5,40E-04	3,80E-04	8,90E-03	8,80E-03	0,22	0,09	34	8	1,52	0,43	2,6	0,8	2,00E-01	9,40E-02
	Gb	0,94	0,46	0,95	0,25	9,20E-01	3,90E-01	4,90E-01	2,60E-01	1,25	0,44	26	12	1,73	0,24	1,8	0,4	1,10E-00	3,80E-01
	IO	0,57	0,28	1,7	0,78	6,10E-01	3,40E-01	2,20E-01	1,50E-01	0,65	0,16	110	61	8,2	5,46	7,3	6	5,00E-01	1,50E-01
	Lt	0,4	0,26	0,44	0,25	8,60E-02	7,70E-02	1,90E-02	1,60E-02	0,34	0,08	21	6	0,74	0,05	1,2	0,1	3,30E-01	1,60E-01
	Ey	0,16	0,07	1,29	0,63	8,20E-04	4,80E-04	6,10E-02	1,00E-02	0,44	0,07	24	5	2,29	1,36	3,4	2	5,60E-01	3,50E-01

Expressions génétiques relatives Branches OSQUAR I	gpx		gst		mcr		sod		cat		cyp1a1		cox1		mt1		mt2		sodmt		
	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	
Juil. 10	Ar	0,11	0,07	0,09	0,06	1,30E-02	5,00E-03	1,00E-04	5,40E-05	2,20E-02	1,20E-02	0,71	0,43	45	24	0,55	0,31	0,7	0,4	1,20E-01	7,00E-02
	Bé	0,15	0,03	0,07	0,02	1,10E-01	7,00E-02	4,20E+00	4,20E+00	8,70E-02	5,20E-02	0,23	0,05	34	5	0,9	0,35	1,9	0,4	2,60E-01	1,40E-01
	Gb	0,36	0,12	0,28	0,17	2,50E-01	1,40E-01	1,30E+00	1,20E+00	2,40E-01	1,20E-01	0,75	0,22	23	6	0,79	0,12	0,9	0,2	1,70E-01	5,00E-02
	Io	0,26	0,03	0,1	0,04	1,20E-03	7,20E-04	2,50E+00	2,10E+00	2,20E-03	6,70E-04	0,58	0,25	37	3	0,96	0,27	1,1	0,3	4,50E-02	4,60E-03
	L4	0,11	0,09	0,03	0,03	7,00E-04	2,10E-04	3,50E+00	3,40E+00	1,00E-03	6,90E-04	0,26	0,2	53	43	0,34	0,2	0,4	0,2	1,00E-02	7,30E-03
Oct. 10	Ey	0,13	0,02	0,04	0	1,80E-03	5,10E-04	2,00E-01	1,90E-01	1,70E-02	6,80E-03	0,25	0,06	31	4	0,43	0,08	0,5	0,1	6,10E-02	5,70E-03
	Ar																				
	Bé	0,3	0,03	0,1	0,05	2,30E-03	1,40E-03			1,20E-04	4,90E-05	0,04	0,03	11	2	0,67	0,11	3,1	2,3	5,60E-02	2,40E-02
	Gb	0,39	0,16	0,38	0,14	3,10E-02	1,10E-02	7,90E-02	7,90E-02	3,10E-03	5,70E-04	0,31	0,07	45	12	2,5	0,45	3,1	0,9	9,30E-02	2,10E-02
	L4	0,09	0,05	0,12	0,05	3,60E-02	3,40E-02	3,50E-01	3,10E-01	8,40E-02	3,70E-02	0,12	0,06	32	18	1,81	0,87	1,7	1	1,70E-01	8,90E-02
Fév. 11	Ey	0,09	0,01	0,08	0,04	3,50E-02	3,40E-02	2,30E-02	2,20E-02	4,10E-02	2,00E-02	0,06	0,02	8	1	0,5	0,09	0,4	0,1	7,30E-02	9,00E-03
	Ar	0,21	0,06	0,26	0,1	2,20E-04	7,30E-05			1,80E-03	1,60E-03	0,4	0,13	54	11	5,11	3,11	6,5	4,4	1,50E-01	6,30E-02
	Bé	0,42	0,17	0,52	0,36	1,10E-01	6,30E-02	5,40E-03	1,60E-03	1,60E-01	1,00E-01	0,21	0,06	31	5	1,25	0,56	1,3	0,5	2,70E-01	1,40E-01
	Gb	0,12	0,03	0,1	0,07	6,50E-03	4,90E-03	8,50E-03	4,00E-03	4,10E-02	8,00E-03	0,1	0,03	23	4	0,73	0,14	0,7	0,1	1,30E-01	2,00E-02
	L4	0,22	0,06	0,39	0,2	1,30E-01	7,30E-02	1,70E-02	1,10E-02	1,70E-01	6,90E-02	0,4	0,21	46	27	4,25	3,73	4	3,4	3,70E-01	2,10E-01
Ey	0,17	0,05	0,15	0,05	2,10E-02	1,30E-02	2,00E-03	1,20E-03	6,90E-02	2,20E-02	0,16	0,04	34	8	1,42	0,52	1,6	0,6	2,40E-01	5,10E-01	

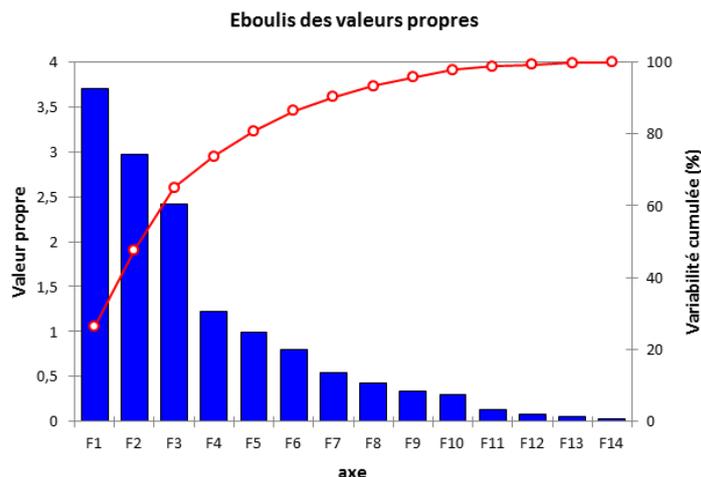
Expressions génétiques relatives Glande digestive OSQUAR I	gpx		gst		mcr		sod		cat		cyp1a1		cox1		mt1		mt2		sodmt		
	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	
Juil. 10	Ar	0,15	0,06	0,52	0,3	9,90E-03	7,10E-03	9,00E-04	5,60E-04	2,60E-02	1,00E-02	0,79	0,24	143	61	22,62	10,96	38	17,7	2,20E-01	6,50E-02
	Bé	0,13	0,05	0,41	0,15	2,90E-00	2,90E-00	1,10E-04	6,70E-05	9,50E-02	2,00E-02	0,99	0,37	150	51	8,4	2,37	38,1	13,7	4,20E-01	1,90E-01
	Gb	0,7	0,44	0,69	0,29	2,90E-01	2,50E-01	3,60E-02	2,30E-02	1,00E-01	3,50E-02	0,39	0,13	30	7	2,02	0,48	2,6	0,7	1,40E-01	2,40E-02
	Io	0,23	0,05	0,47	0,38	1,00E-02	5,60E-03			4,80E-03	2,60E-03	0,67	0,4	4	3	2,4	0,81	83,7	45	6,00E-02	4,70E-02
	L4	0,23	0,09	0,42	0,22	3,30E-03	1,20E-03	1,30E+00	1,20E+00	9,10E-04	6,70E-04	2,19	1,11	27	12	13,12	9,02	54	36,9	5,40E-02	2,10E-02
Oct. 10	Ey	0,25	0,04	0,55	0,17	9,90E-04	3,20E-04	1,00E+00	1,00E+00	1,00E-02	6,60E-03	1,22	0,55	114	47	5,72	2,04	51,4	41,8	9,30E-02	3,70E-02
	Ar																				
	Bé	0,21	0,04	0,16	0,07	1,60E-03	1,10E-03			1,50E-02	1,40E-02	0,22	0,14	18	5	1,93	0,82	4,8	1,5	6,30E-02	3,20E-02
	Gb	0,08	0,03	0,32	0,15	1,70E-03	5,20E-04			3,90E-02	1,50E-02	0,13	0,03	28	7	10,42	8,33	23,6	19	1,80E-01	4,50E-02
	Io	0,15	0,11	0,22	0,1	2,90E-02	2,70E-02			3,20E-03	2,80E-03	0,86	0,64	70	50	28,15	24,43	126,7	122,6	1,00E-01	4,40E-02
Fév. 11	L4	0,13	0,05	0,89	0,21	2,20E-02	1,80E-02	3,10E-02	2,90E-02	6,90E-02	2,60E-02	0,23	0,08	70	19	13,02	5,76	15,4	11,1	3,60E-01	9,20E-02
	Ey	0,42	0,07	0,52	0,1	1,20E-01	6,80E-02	4,30E-02	1,80E-02	2,20E-01	9,20E-02	0,42	0,13	37	12	2,87	0,95	4,5	2,1	2,90E-01	2,70E-02
	Ar	0,13	0,07	0,93	0,19	1,20E-03	4,30E-04			5,30E-02	2,70E-02	0,37	0,07	55	9	6,16	2,72	10,7	4,5	6,50E-01	3,10E-01
	Bé	0,97	0,45	2,99	2,36	3,70E-01	2,10E-01	6,40E-02	5,40E-02	5,40E-01	2,50E-01	0,29	0,08	43	16	31,17	27,54	77,8	74,9	3,80E-01	1,90E-01
	Gb	0,37	0,18	2,97	1,74	1,50E-03	3,90E-04			3,20E-01	2,20E-01	0,73	0,34	122	44	15,7	8,8	43,1	25,4	1,10E+00	3,80E-01
L4	0,68	0,4	2,44	1,17	1,50E-02	9,90E-03	9,80E-06	8,80E-06	3,80E-01	2,40E-01	1,18	0,66	151	74	15,71	10,9	30,8	20,2	1,20E+00	5,10E-01	
Ey																					

Expressions génétiques relatives Branches OSQUAR 2	gpx		gat		mcr		sod		cat		cyp17a1		cor1		mt1		mt2		sodmt		
	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	
Juil. 11	Ar	0,07	0,03	0,09	0,05	2,90E-02	1,10E-02	1,30E-01	6,90E-02	3,50E-02	2,20E-02	0,2	0,09	6	2	0,3	0,07	0,3	0,1	2,80E-01	1,20E-01
	Bé	0,14	0,04	0,07	0,02	1,90E-02	9,90E-03	2,00E-01	6,00E-02	3,70E-02	1,10E-02	0,05	0,02	7	1	0,28	0,1	0,3	0,1	8,70E-02	2,70E-02
	Gb	0,25	0,04	0,13	0,03	2,10E-01	1,00E-01	2,20E-01	8,80E-02	4,30E-01	1,00E-01	0,48	0,14	8	1	0,59	0,1	0,7	0,2	1,40E-01	5,70E-02
	IO	0,59	0,13	0,28	0,08	2,00E-01	4,40E-02	2,70E-01	8,00E-02	2,70E-01	1,00E-01	0,37	0,14	4	0	0,31	0,05	0,5	0,1	4,10E-01	1,80E-01
	Lt	0,42	0,21	0,23	0,09	2,20E-01	1,00E-01	3,30E-01	1,30E-01	2,70E-01	1,00E-01	0,44	0,19	6	2	0,42	0,14	0,5	0	4,30E-01	1,80E-01
Oct. 11	Ey	0,14	0,02	0,04	0	1,50E-02	4,30E-03	4,20E-02	1,30E-02	3,70E-02	1,00E-02	0,07	0,02	7	1	0,28	0,02	0,3	0	7,30E-02	9,20E-03
	Ar	0,53	0,12	0,4	0,1	1,80E-01	4,20E-02	3,00E-01	1,50E-01	1,60E-01	4,60E-02	0,22	0,09	7	1	1,32	0,52	0,8	0,2	1,80E-01	5,80E-02
	Bé	0,17	0,05	0,38	0,31	1,70E-01	5,80E-02	2,00E-01	6,40E-03	8,30E-02	4,30E-02	0,23	0,09	7	2	0,61	0,35	0,5	0,4	3,10E-01	1,60E-01
	Gb	0,15	0,03	0,19	0,07	6,20E-02	2,10E-02	1,10E-01	1,50E-02	8,60E-02	3,50E-02	0,11	0,01	8	1	0,34	0,07	0,3	0	1,10E-01	1,60E-02
	IO	0,19	0,07	0,19	0,07	1,10E-01	4,30E-02	1,90E-01	5,30E-02	1,50E-01	3,30E-02	0,28	0,11	5	1	0,45	0,12	0,4	0	2,50E-01	7,90E-02
Janv. 12	Lt	0,25	0,11	0,35	0,09	2,10E-01	6,70E-02	2,80E-01	6,30E-02	1,20E-01	5,60E-02	0,2	0,07	6	1	0,59	0,05	0,3	0,1	1,30E-01	2,30E-02
	Ey	0,48	0,12	0,27	0,06	2,40E-01	3,70E-02	1,90E-01	5,20E-02	1,70E-01	2,60E-03	0,15	0,01	5	1	0,22	0,09	0,5	0,1	1,80E-01	4,40E-02
	Ar	0,31	0,13	0,06	0,02	1,10E-01	4,90E-02	1,40E-01	2,20E-02	1,70E-01	1,00E-01	0,33	0,09	6	1	0,29	0,05	0,3	0,1	2,50E-01	1,10E-01
	Bé	0,09	0,02	0,06	0,01	8,20E-02	2,90E-02	7,10E-02	1,20E-02	9,80E-02	5,10E-02	0,25	0,06	7	0	0,37	0,1	0,4	0,1	4,80E-01	2,20E-01
	Gb	0,24	0,08	0,15	0,07	9,80E-02	1,50E-02	3,00E-01	3,00E-02	4,00E-02	1,60E-02	0,24	0,09	1	0	0,44	0,1	0,4	0,1	1,40E-01	2,70E-02
mai-12	IO	0,2	0,05	0,06	0,02	3,00E-03	8,20E-04	1,00E-01	6,70E-02	4,00E-02	1,60E-02	0,24	0,01	21	7	0,45	0,09	0,5	0	1,10E-01	2,70E-02
	Lt	0,09	0,01	0,04	0	8,30E-03	3,50E-03	8,40E-02	1,50E-02	1,50E-02	5,40E-03	0,14	0,02	11	1	0,47	0,04	0,6	0	8,10E-02	1,30E-02
	Ey	0,11	0,02	0,09	0,02	1,90E-02	5,30E-03	6,80E-02	3,00E-02	2,90E-02	7,50E-03	0,23	0,04	12	2	0,34	0,02	0,3	0	9,40E-02	2,80E-02
	Ar	0,4	0,03	0,2	0,03	1,10E-01	4,50E-02	1,50E-01	4,60E-02	1,70E-01	5,10E-02	0,5	0,13	7	1	0,47	0,12	0,3	0	8,70E-02	1,90E-02
	Gb	0,4	0,07	0,38	0,21	1,80E-01	5,10E-02	2,70E-01	1,70E-01	9,20E-02	8,70E-03	0,29	0,03	6	1	0,46	0,04	0,7	0,2	2,10E-01	6,80E-02
Sept. 12	Bé	0,29	0,09	0,38	0,05	2,30E-01	9,80E-02	2,70E-01	1,60E-01	3,10E-01	9,10E-02	0,29	0,03	6	1	0,79	0,3	1	0,4	4,90E-01	1,90E-01
	IO	0,26	0,11	0,45	0,14	2,80E-01	1,60E-01	3,10E-01	1,40E-01	1,50E-01	6,10E-02	0,32	0,12	5	1	0,45	0,05	0,5	0,1	2,40E-01	7,40E-02
	Lt	0,3	0,1	0,34	0,04	1,30E-01	6,60E-02	1,80E-01	7,10E-02	2,10E-01	6,00E-02	0,31	0,14	1	0	1,07	0,34	1,3	0,3	7,50E-01	1,10E-01
	Ey	0,23	0,09	0,34	0,04	1,20E-01	5,10E-02	3,40E-01	1,60E-01	1,50E-01	1,70E-02	0,52	0,14	10	2	0,92	0,25	1,2	0,4	4,10E-01	1,80E-01
	Ar	0,11	0,04	0,03	0,01	1,40E-02	5,30E-03	5,00E-02	1,10E-02	2,20E-02	4,80E-03	0,07	0,02	6	0	0,15	0,01	0,2	0	6,20E-02	5,20E-03
IO	Bé	0,04	0,01	0,03	0,01	9,60E-03	3,80E-03	8,90E-02	2,80E-03	8,90E-03	4,20E-03	0,1	0,03	6	1	0,21	0,02	0,2	0	7,70E-02	4,90E-03
	Gb	0,06	0	0,03	0	9,90E-03	3,50E-03	3,30E-02	8,00E-03	1,50E-02	1,90E-03	0,08	0,01	6	1	0,19	0,03	0,2	0	7,90E-02	1,40E-02
	Ey	0,11	0,01	0,09	0,02	3,60E-02	9,40E-03	6,80E-02	2,40E-02	5,50E-02	1,30E-02	0,04	0,01	3	0	0,16	0,01	0,2	0	4,80E-02	8,40E-03

Expressions génétiques relatives Claque digestive OSQUAR 2	gpx		gat		mcr		sod		cat		cyp17a1		cor1		mt1		mt2		sodmt		
	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	
Juil. 11	Ar	0,07	0,02	0,25	0,06	2,10E-03	1,20E-03	2,00E-01	6,80E-02	4,60E-02	2,10E-02	0,11	0,04	33	7	2,04	0,52	2,2	0,6	1,20E-01	4,20E-02
	Bé	0,58	0,31	0,28	0,1	2,10E-01	1,20E-01	1,20E-01	7,30E-02	1,10E-01	8,70E-02	0,21	0,07	40	18	2,32	1,02	5,2	2,2	5,80E-01	4,40E-01
	Gb	0,15	0,07	0,19	0,07	6,70E-03	2,60E-03	1,60E-01	1,30E-02	4,40E-02	4,10E-03	0,14	0,01	30	8	2,28	0,58	3,1	1	1,80E-01	4,90E-02
	IO	0,17	0,03	0,51	0,05	4,10E-04	3,30E-05	2,00E-01	4,20E-02	1,50E-02	2,80E-03	0,17	0,03	49	9	2,07	0,32	5,1	1,3	1,50E-01	2,20E-02
	Lt	0,09	0,05	0,17	0,05	1,90E-03	7,80E-04	1,40E-01	9,60E-03	2,20E-02	3,80E-03	0,12	0,04	17	1	0,69	0,08	1,1	0,2	1,30E-01	2,30E-02
Oct. 11	Ey	0,18	0,03	0,26	0,01	1,50E-03	7,50E-04	7,50E-02	4,80E-03	2,60E-02	1,30E-03	0,14	0,03	41	6	2,72	0,22	4,1	0,5	1,10E-01	1,90E-02
	Ar	0,21	0,05	0,64	0,16	3,40E-02	2,40E-02	2,80E-01	2,40E-02	2,20E-01	7,20E-02	0,33	0,01	62	26	2,97	0,74	4,6	1,6	3,40E-01	4,00E-02
	Bé	0,28	0,07	0,44	0,07	6,60E-02	3,50E-02	1,40E-01	4,40E-02	5,90E-02	2,50E-02	0,31	0,14	28	10	2	0,49	2,8	0,2	3,00E-01	9,10E-02
	Gb	0,14	0,03	0,28	0,05	4,70E-04	4,10E-04	1,20E-01	4,40E-02	1,50E-02	5,40E-03	0,14	0,04	56	12	2,35	0,5	5	1,4	1,30E-01	4,80E-03
	IO	0,17	0,07	2,56	1,71	2,20E-03	1,80E-03	2,90E-01	1,60E-01	3,30E-02	2,10E-02	0,14	0,06	100	46	1,39	0,74	1,4	0,7	3,20E-01	1,60E-01
Janv. 12	Lt	0,12	0,02	0,4	0,16	2,40E-03	1,20E-03	2,40E-01	7,60E-02	1,10E-02	1,90E-03	0,06	0,01	84	31	2,02	0,95	3,3	1,5	1,20E-01	2,80E-02
	Ey	0,52	0,19	1,27	0,48	2,20E-01	8,10E-02	5,10E-01	1,30E-01	2,30E-01	1,40E-01	0,66	0,23	80	7	1,44	0,22	1,4	0,1	3,60E-01	9,50E-02
	Ar	0,38	0,09	1,84	0,23	1,20E-01	4,20E-02	3,80E-01	1,90E-01	3,00E-01	1,30E-01	0,94	0,28	85	27	7,02	2,03	21	7,3	9,50E-01	1,80E-01
	Bé	0,3	0,1	1,16	0,14	7,40E-02	3,40E-02	6,20E-01	7,20E-02	6,90E-01	3,20E-01	0,7	0,19	29	9	4,06	0,79	7,7	3,4	1,30E+00	6,40E-01
	Gb	0,54	0,26	0,45	0,12	1,00E-01	5,70E-02	2,30E-01	7,90E-02	1,50E-01	5,50E-02	0,5	0,17	18	2	1,39	0,02	1,9	0,6	8,20E-02	4,00E-02
mai-12	IO	0,7	0,24	1,03	0,27	4,80E-01	1,60E-01	5,00E-01	1,40E-01	3,80E-01	9,20E-02	1,01	0,35	25	9	2,02	0,67	4,1	2,1	9,70E-01	2,00E-01
	Lt	0,68	0,28	0,91	0,29	4,20E-01	2,10E-01	5,60E-01	1,90E-01	4,40E-01	1,30E-01	0,51	0,03	14	5	1,25	0,4	2	0,8	2,70E-01	4,00E-02
	Ey	0,31	0,13	0,27	0,12	7,30E-02	2,60E-02	1,40E-01	1,90E-02	4,60E-02	1,90E-02	0,47	0,1	18	5	1,45	0,6	2	1,1	3,70E-01	2,30E-01
	Ar	0,41	0,11	0,43	0,05	1,40E-01	6,20E-02	2,50E-01	7,80E-02	1,20E-01	3,40E-02	0,28	0,05	20	5	1,43	0,32	1,3	0,3	1,50E-01	2,00E-02
	Bé	0,24	0,01	0,73	0,06	5,00E-02	4,30E-02	3,30E-01	1,10E-01	5,00E-02	1,40E-02	0,65	0,15	65	32						

8. Détail des ACP réalisées lors de l'approche *in situ*

ACP – ASCOBAR année 2 – Branchies



Variables

Les cosinus carrés des variables indiquent « la qualité de représentation » de la variable dans le plan factoriel. Les variables mal représentées sur les deux facteurs choisis (F1 et F2) ont été exclues de la représentation graphique (Cd, M, S, Chla, *cyp1a1*, *cox*, *mt1*, *mt2*). Les contributions des variables indiquent « la participation relative » de chaque variable à la construction des axes (ou facteurs : F1 et F2). En rouge apparaissent les variables dont la contribution est supérieure à la contribution moyenne.

	Cosinus carrés des variables :		Contributions des variables (%) :	
	F1	F2	F1	F2
HAP	0,559	0,008	15,073	0,277
Cu	0,117	0,312	3,145	10,525
Zn	0,005	0,415	0,131	13,971
Cd	0,017	0,071	0,463	2,401
Mt	0,565	0,046	15,243	1,550
IC	0,475	0,021	12,802	0,694
L	0,382	0,181	10,306	6,081
M	0,047	0,197	1,265	6,623
T	0,200	0,543	5,388	18,277
S	0,070	0,050	1,898	1,670
O	0,305	0,505	8,224	17,021
pH	0,696	0,081	18,768	2,741
MES	0,261	0,454	7,035	15,308
Chla	0,010	0,085	0,259	2,861
<i>gpx</i>	0,375	0,000		
<i>gst</i>	0,199	0,302		
<i>mxr</i>	0,337	0,082		
<i>sod</i>	0,156	0,116		
<i>cyp1a1</i>	0,093	0,156		
<i>cox</i>	0,060	0,009		
<i>mt1</i>	0,004	0,044		
<i>mt2</i>	0,080	0,026		
<i>sodmt</i>	0,600	0,170		

Les résultats correspondant aux variables supplémentaires sont affichés dans la seconde partie du tableau

Les valeurs en gras correspondent pour chaque variable au facteur pour lequel le cosinus carré est le plus grand

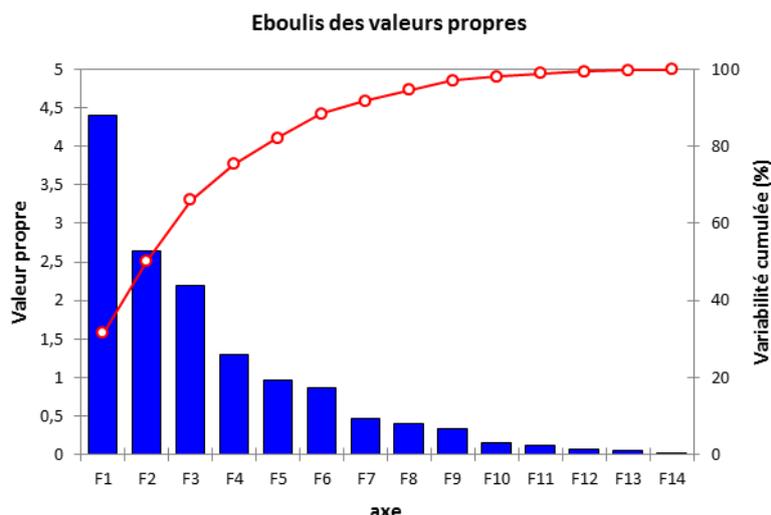
Individus

Les cosinus carré des observations et leurs contributions relatives correspondent respectivement à leur « qualité de représentation dans le plan factoriel » et à leur « participation relative » à la construction des axes. Pour alléger la représentation graphique, seules les observations présentant un cosinus carré maximal (gras) ou une contribution relative supérieure à la contribution moyenne (rouge) ont été conservées.

Cosinus carrés des observations :			Contributions des observations (%) :		
	F1	F2		F1	F2
ArM09	0,444	0,082	ArM09	7,252	1,663
ArJu09	0,168	0,126	ArJu09	2,949	2,766
ArS09	0,139	0,048	ArS09	0,593	0,254
ArO09	0,004	0,133	ArO09	0,046	1,698
ArD09	0,117	0,566	ArD09	0,669	4,046
ArJa10	0,115	0,423	ArJa10	2,421	11,149
BeM09	0,536	0,316	BeM09	9,328	6,866
BeJu09	0,018	0,402	BeJu09	0,100	2,820
BeS09	0,017	0,215	BeS09	0,148	2,362
BeO09	0,013	0,001	BeO09	0,045	0,003
BeD09	0,245	0,256	BeD09	1,249	1,630
BeJa10	0,024	0,337	BeJa10	0,138	2,387
GbM09	0,627	0,212	GbM09	12,726	5,382
GbJu09	0,001	0,133	GbJu09	0,007	1,275
GbS09	0,003	0,114	GbS09	0,017	0,890
GbO09	0,000	0,107	GbO09	0,004	1,123
GbD09	0,142	0,385	GbD09	1,405	4,756
GbJa10	0,160	0,405	GbJa10	1,551	4,921
IOM09	0,547	0,036	IOM09	6,684	0,547
IOJu09	0,153	0,380	IOJu09	2,411	7,461
IOS09	0,015	0,562	IOS09	0,079	3,648
IOO09	0,095	0,000	IOO09	0,761	0,002
IOD09	0,501	0,028	IOD09	2,611	0,182
IOJa10	0,345	0,330	IOJa10	3,798	4,542
LtM09	0,404	0,000	LtM09	5,538	0,000
LtJu09	0,196	0,513	LtJu09	1,768	5,782
LtS09	0,026	0,784	LtS09	0,183	6,946
LtO09	0,283	0,255	LtO09	3,221	3,627
LtD09	0,581	0,001	LtD09	4,595	0,009
LtJa10	0,315	0,001	LtJa10	5,096	0,016
EyM09	0,533	0,008	EyM09	8,066	0,151
EyJu09	0,211	0,154	EyJu09	1,843	1,685
EyS09	0,165	0,371	EyS09	1,320	3,710
EyO09	0,132	0,259	EyO09	1,948	4,789
EyD09	0,157	0,061	EyD09	1,428	0,689
EyJa10	0,510	0,011	EyJa10	8,004	0,223

Les valeurs en gras correspondent pour chaque observation au facteur pour lequel le cosinus carré est le plus grand

ACP – ASCOBAR année 2 – Glandes digestives



Variables

Les données concernant les variables employées dans l'ACP des glandes digestives sont présentées de la même manière que précédemment pour les branchies. La variable L n'a pas été conservée dans la représentation graphique en dépit d'une contribution notable puisque sa qualité de représentation n'était pas suffisante.

Cosinus carrés des variables :

	F1	F2
HAP	0,449	0,027
Cu	0,421	0,000
Zn	0,429	0,013
Cd	0,100	0,024
Mt	0,666	0,007
IC	0,486	0,001
L	0,338	0,002
M	0,009	0,011
T	0,256	0,601
S	0,131	0,393
O	0,341	0,506
pH	0,577	0,207
MES	0,200	0,695
Chla	0,002	0,149
<i>gpx</i>	0,239	0,007
<i>gst</i>	0,009	0,004
<i>mxr</i>	0,120	0,091
<i>sod</i>	0,029	0,102
<i>cyp1a1</i>	0,189	0,073
<i>cox1</i>	0,025	0,079
<i>mt1</i>	0,050	0,099
<i>mt2</i>	0,010	0,011
<i>sodmt</i>	0,352	0,184

Contributions des variables (%) :

	F1	F2
HAP	10,198	1,013
Cu	9,550	0,008
Zn	9,734	0,484
Cd	2,274	0,902
Mt	15,124	0,249
IC	11,042	0,047
L	7,674	0,075
M	0,204	0,420
T	5,802	22,808
S	2,974	14,905
O	7,740	19,206
pH	13,110	7,843
MES	4,537	26,375
Chla	0,036	5,664

Les résultats correspondant aux variables supplémentaires sont affichés dans la seconde partie du tableau

Les valeurs en gras correspondent pour chaque variable au facteur pour lequel le cosinus carré est le plus grand

Individus

Le choix des individus représentés dans le plan factoriel est basé sur les tableaux suivants (mêmes commentaires que pour les branchies). Les individus ne présentant pas une contribution relative suffisante ou *a minima* une bonne qualité de représentation ont été écartés.

Cosinus carrés des observations :			Contributions des observations (%) :		
	F1	F2		F1	F2
ArM09	0,469	0,283	ArM09	7,001	7,053
ArJu09	0,001	0,111	ArJu09	0,016	2,749
ArS09	0,012	0,379	ArS09	0,049	2,520
ArO09	0,017	0,162	ArO09	0,111	1,748
ArD09	0,300	0,110	ArD09	2,456	1,503
ArJa10	0,082	0,021	ArJa10	1,431	0,607
BeM09	0,622	0,280	BeM09	8,542	6,432
BeJu09	0,098	0,310	BeJu09	0,390	2,054
BeS09	0,017	0,154	BeS09	0,127	1,878
BeO09	0,194	0,178	BeO09	0,539	0,828
BeD09	0,056	0,236	BeD09	0,314	2,194
BeJa10	0,202	0,138	BeJa10	1,077	1,226
GbM09	0,647	0,230	GbM09	11,019	6,539
GbJu09	0,000	0,266	GbJu09	0,003	2,583
GbS09	0,003	0,326	GbS09	0,014	2,669
GbO09	0,102	0,109	GbO09	0,640	1,152
GbD09	0,001	0,195	GbD09	0,005	1,885
GbJa10	0,205	0,046	GbJa10	1,677	0,630
IOM09	0,482	0,153	IOM09	5,579	2,959
IOJu09	0,363	0,238	IOJu09	3,730	4,094
IOS09	0,195	0,298	IOS09	0,963	2,453
IOO09	0,004	0,178	IOO09	0,025	1,979
IOD09	0,411	0,141	IOD09	1,360	0,779
IOJa10	0,376	0,307	IOJa10	3,547	4,843
LtM09	0,403	0,181	LtM09	3,927	2,939
LtJu09	0,209	0,409	LtJu09	1,420	4,654
LtS09	0,033	0,451	LtS09	0,152	3,512
LtO09	0,185	0,173	LtO09	1,488	2,333
LtD09	0,503	0,061	LtD09	3,378	0,690
LtJa10	0,560	0,156	LtJa10	9,582	4,450
EyM09	0,513	0,159	EyM09	5,961	3,085
EyJu09	0,324	0,298	EyJu09	2,600	4,003
EyS09	0,102	0,535	EyS09	0,454	3,990
EyO09	0,228	0,121	EyO09	2,543	2,255
EyD09	0,272	0,104	EyD09	1,526	0,973
EyJa10	0,646	0,089	EyJa10	16,354	3,760

Les valeurs en gras correspondent pour chaque observation au facteur pour lequel le cosinus carré est le plus grand

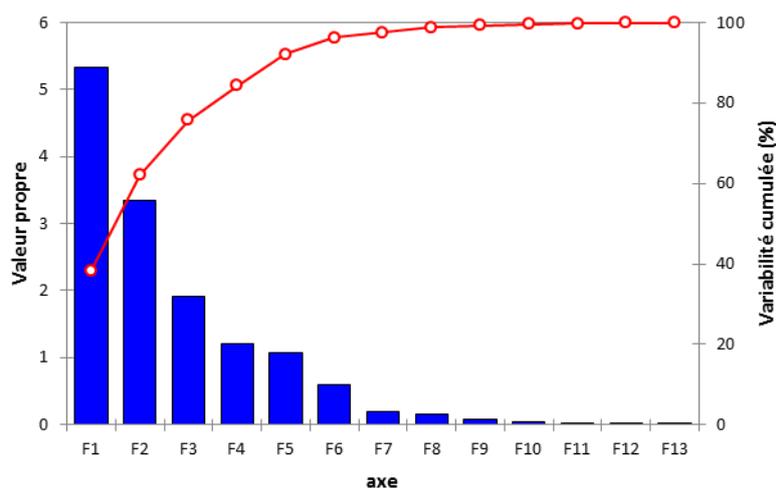
ACP – OSQUAR année 1 – Branchies

Matrice des corrélations de Pearson

Variables	M	L	IC	T	S	O	pH	MES	Chla	HAP	Cu	Zn	Cd	MT
M	1,00	0,90	0,07	-0,52	-0,35	0,54	-0,04	0,23	0,43	-0,06	-0,23	-0,66	-0,07	-0,06
L	0,90	1,00	-0,20	-0,64	-0,28	0,65	-0,18	0,15	0,46	-0,08	-0,34	-0,68	-0,34	-0,04
IC	0,07	-0,20	1,00	0,69	0,22	-0,67	0,51	0,05	-0,52	-0,33	0,19	0,10	0,27	-0,38
T	-0,52	-0,64	0,69	1,00	0,64	-1,00	0,42	0,06	-0,75	-0,43	0,09	0,41	0,03	-0,40
S	-0,35	-0,28	0,22	0,64	1,00	-0,63	0,14	0,33	-0,60	-0,71	-0,17	0,22	-0,54	-0,41
O	0,54	0,65	-0,67	-1,00	-0,63	1,00	-0,33	-0,04	0,70	0,36	-0,14	-0,41	0,01	0,35
pH	-0,04	-0,18	0,51	0,42	0,14	-0,33	1,00	0,03	-0,73	-0,56	-0,37	0,11	0,50	-0,49
MES	0,23	0,15	0,05	0,06	0,33	-0,04	0,03	1,00	0,12	-0,53	-0,31	0,12	-0,12	-0,48
Chla	0,43	0,46	-0,52	-0,75	-0,60	0,70	-0,73	0,12	1,00	0,63	0,19	-0,25	-0,12	0,47
HAP	-0,06	-0,08	-0,33	-0,43	-0,71	0,36	-0,56	-0,53	0,63	1,00	0,58	0,08	0,22	0,72
Cu	-0,23	-0,34	0,19	0,09	-0,17	-0,14	-0,37	-0,31	0,19	0,58	1,00	0,50	0,02	0,68
Zn	-0,66	-0,68	0,10	0,41	0,22	-0,41	0,11	0,12	-0,25	0,08	0,50	1,00	0,17	0,17
Cd	-0,07	-0,34	0,27	0,03	-0,54	0,01	0,50	-0,12	-0,12	0,22	0,02	0,17	1,00	-0,11
MT	-0,06	-0,04	-0,38	-0,40	-0,41	0,35	-0,49	-0,48	0,47	0,72	0,68	0,17	-0,11	1,00

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$ et indiquent une corrélation ou une anti-corrélation significative.

Eboulis des valeurs propres



Variables

Cosinus carrés des variables :

	F1	F2
M	0,278	0,416
L	0,382	0,463
IC	0,399	0,003
T	0,867	0,026
S	0,499	0,041
O	0,807	0,046
pH	0,379	0,082
MES	0,029	0,255
Chla	0,778	0,005
HAP	0,403	0,477
Cu	0,011	0,651
Zn	0,185	0,398
Cd	0,010	0,042
MT	0,312	0,448

Contributions des variables (%) :

	F1	F2
M	5,205	12,411
L	7,154	13,813
IC	7,472	0,088
T	16,251	0,786
S	9,354	1,231
O	15,114	1,367
pH	7,092	2,440
MES	0,544	7,603
Chla	14,568	0,138
HAP	7,550	14,225
Cu	0,202	19,412
Zn	3,457	11,862
Cd	0,194	1,257
MT	5,843	13,369

Les valeurs en gras correspondent pour chaque variable au facteur pour lequel le cosinus carré est le plus grand

Individus

Cosinus carrés des observations :

	F1	F2
Ar J10	0,517	0,233
Ar F11	0,166	0,732
Bé J10	0,723	0,008
Bé O10	0,079	0,001
Bé F11	0,082	0,074
Gb J10	0,728	0,007
Gb O10	0,157	0,411
lo J10	0,592	0,020
lo O10	0,140	0,054
lo F11	0,737	0,042
Lt J10	0,553	0,065
Lt O10	0,175	0,258
Lt F11	0,397	0,184
Ey J10	0,307	0,324
Ey O10	0,120	0,279
Ey F11	0,562	0,184

Contributions des observations (%) :

	F1	F2
Ar J10	8,606	6,180
Ar F11	6,427	45,004
Bé J10	8,463	0,147
Bé O10	0,648	0,008
Bé F11	1,173	1,697
Gb J10	10,219	0,150
Gb O10	0,942	3,919
lo J10	4,652	0,256
lo O10	1,149	0,705
lo F11	15,275	1,374
Lt J10	7,744	1,446
Lt O10	3,075	7,211
Lt F11	9,148	6,747
Ey J10	6,968	11,720
Ey O10	1,691	6,251
Ey F11	13,819	7,186

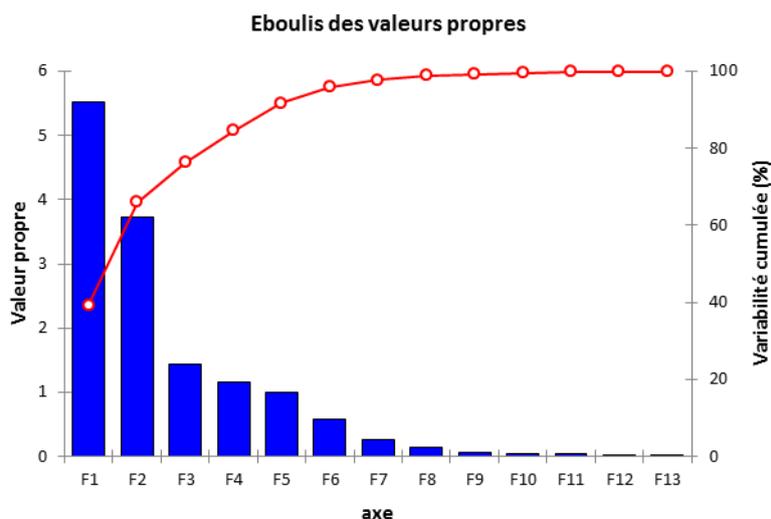
Les valeurs en gras correspondent pour chaque observation au facteur pour lequel le cosinus carré est le plus grand

ACP – OSQUAR année 1 – Glandes digestives

Matrice des corrélations de Pearson

Variables	M	L	IC	T	S	O	pH	MES	Chla	HAP	Cu	Zn	Cd	MT
M	1,00	0,90	0,07	-0,52	-0,35	0,54	-0,04	0,23	0,43	-0,06	-0,47	-0,59	-0,21	-0,33
L	0,90	1,00	-0,20	-0,64	-0,28	0,65	-0,18	0,15	0,46	-0,08	-0,58	-0,63	-0,19	-0,43
IC	0,07	-0,20	1,00	0,69	0,22	-0,67	0,51	0,05	-0,52	-0,33	0,02	-0,17	0,35	0,06
T	-0,52	-0,64	0,69	1,00	0,64	-1,00	0,42	0,06	-0,75	-0,43	0,22	0,24	0,51	0,13
S	-0,35	-0,28	0,22	0,64	1,00	-0,63	0,14	0,33	-0,60	-0,71	-0,21	-0,07	0,60	-0,07
O	0,54	0,65	-0,67	-1,00	-0,63	1,00	-0,33	-0,04	0,70	0,36	-0,26	-0,24	-0,44	-0,14
pH	-0,04	-0,18	0,51	0,42	0,14	-0,33	1,00	0,03	-0,73	-0,56	-0,20	0,12	0,78	0,10
MES	0,23	0,15	0,05	0,06	0,33	-0,04	0,03	1,00	0,12	-0,53	-0,27	0,08	0,14	-0,39
Chla	0,43	0,46	-0,52	-0,75	-0,60	0,70	-0,73	0,12	1,00	0,63	0,02	-0,11	-0,85	-0,12
HAP	-0,06	-0,08	-0,33	-0,43	-0,71	0,36	-0,56	-0,53	0,63	1,00	0,52	0,23	-0,83	0,34
Cu	-0,47	-0,58	0,02	0,22	-0,21	-0,26	-0,20	-0,27	0,02	0,52	1,00	0,72	-0,36	0,62
Zn	-0,59	-0,63	-0,17	0,24	-0,07	-0,24	0,12	0,08	-0,11	0,23	0,72	1,00	-0,06	0,48
Cd	-0,21	-0,19	0,35	0,51	0,60	-0,44	0,78	0,14	-0,85	-0,83	-0,36	-0,06	1,00	-0,09
MT	-0,33	-0,43	0,06	0,13	-0,07	-0,14	0,10	-0,39	-0,12	0,34	0,62	0,48	-0,09	1,00

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$ et indiquent une corrélation ou une anti-corrélation significative.



Variables

Cosinus carrés des variables :

	F1	F2
M	0,308	0,393
L	0,409	0,442
IC	0,362	0,031
T	0,847	0,012
S	0,491	0,080
O	0,785	0,025
pH	0,404	0,075
MES	0,008	0,192
Chla	0,833	0,014
HAP	0,379	0,497
Cu	0,010	0,792
Zn	0,066	0,522
Cd	0,587	0,201
MT	0,026	0,461

Contributions des variables (%) :

	F1	F2
M	5,587	10,513
L	7,418	11,840
IC	6,555	0,822
T	15,363	0,324
S	8,896	2,136
O	14,226	0,671
pH	7,328	1,997
MES	0,146	5,147
Chla	15,101	0,364
HAP	6,870	13,300
Cu	0,184	21,206
Zn	1,198	13,970
Cd	10,650	5,381
MT	0,477	12,331

Les valeurs en gras correspondent pour chaque variable au facteur pour lequel le cosinus carré est le plus grand

Individus

Cosinus carrés des observations :

	F1	F2
Ar J10	0,485	0,318
Ar F11	0,222	0,664
Bé J10	0,768	0,016
Bé O10	0,108	0,001
Bé F11	0,142	0,049
Gb J10	0,691	0,040
Gb O10	0,090	0,518
lo J10	0,404	0,000
lo O10	0,189	0,142
lo F11	0,774	0,023
Lt J10	0,546	0,213
Lt O10	0,100	0,564
Lt F11	0,440	0,312
Ey J10	0,321	0,335
Ey O10	0,158	0,060
Ey F11	0,482	0,234

Contributions des observations (%) :

	F1	F2
Ar J10	10,783	10,443
Ar F11	8,280	36,599
Bé J10	10,962	0,333
Bé O10	0,894	0,014
Bé F11	1,899	0,962
Gb J10	11,513	0,979
Gb O10	0,493	4,175
lo J10	3,101	0,001
lo O10	2,558	2,828
lo F11	15,541	0,691
Lt J10	7,369	4,237
Lt O10	1,697	14,171
Lt F11	8,468	8,860
Ey J10	5,015	7,727
Ey O10	1,364	0,764
Ey F11	10,063	7,218

Les valeurs en gras correspondent pour chaque observation au facteur pour lequel le cosinus carré est le plus grand

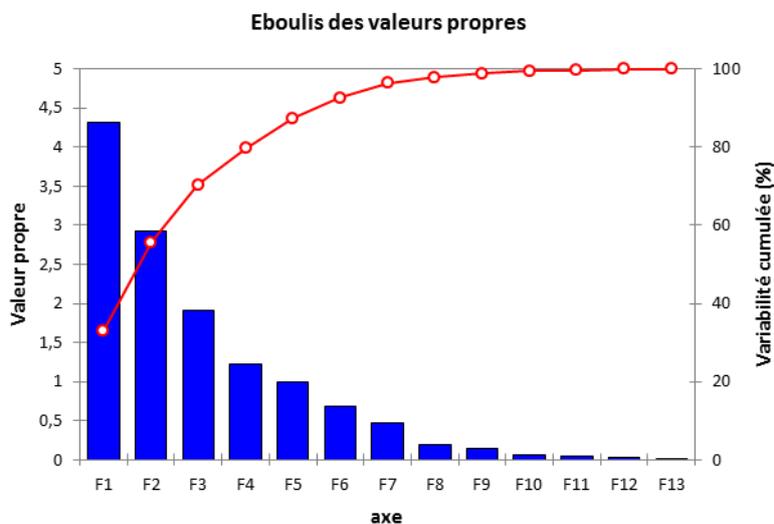
ACP – OSQUAR année 2 – Branchies

Matrice des corrélations de Pearson

Variables	M	L	IC	T	S	O	pH	MES	Chla	HAP	Cu	Zn	Cd	<i>gpx</i>	<i>gst</i>	<i>mxr</i>	<i>sod</i>	<i>cat</i>	<i>cyp1a1</i>	<i>cox1</i>	<i>mt1</i>	<i>mt2</i>	<i>sodmt</i>	
M	1,0	0,9	0,6	0,1	0,2	0,1	0,0	0,0	0,1	-0,5	-0,3	-0,1	0,1	0,0	-0,1	-0,1	-0,2	-0,1	-0,1	-0,2	-0,1	-0,2	-0,2	
L	0,9	1,0	0,3	0,0	0,2	0,2	0,0	0,1	0,2	-0,6	-0,4	0,1	0,2	0,0	-0,2	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,2	-0,1	-0,3	-0,3	
IC	0,6	0,3	1,0	0,4	0,4	-0,3	0,5	-0,5	0,1	-0,5	-0,4	-0,5	-0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,0	-0,4	0,0	-0,1	0,0	
T	0,1	0,0	0,4	1,0	0,4	-0,9	0,5	-0,9	0,0	-0,2	0,0	0,0	-0,1	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	-0,1	-0,6	0,0	0,0	0,1	
S	0,2	0,2	0,4	0,4	1,0	-0,4	0,8	-0,3	0,0	-0,6	-0,3	-0,1	-0,2	0,0	-0,3	0,0	-0,2	0,0	-0,3	-0,4	-0,4	-0,6	-0,3	
O	0,1	0,2	-0,3	-0,9	-0,4	1,0	-0,5	0,8	0,3	0,0	-0,1	0,1	0,3	-0,2	-0,2	-0,2	-0,2	-0,2	0,2	0,5	0,1	0,1	0,0	
pH	0,0	0,0	0,5	0,5	0,8	-0,5	1,0	-0,5	0,1	-0,5	-0,3	-0,3	-0,4	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	-0,2	-0,3	-0,1	-0,3	-0,2	
MES	0,0	0,1	-0,5	-0,9	-0,3	0,8	-0,5	1,0	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	-0,3	-0,4	-0,3	-0,3	-0,3	0,0	0,4	-0,2	-0,1	-0,1	
Chla	0,1	0,2	0,1	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	1,0	-0,1	-0,2	-0,1	0,0	0,1	0,5	0,3	0,3	0,0	0,0	-0,1	0,4	0,2	0,0	
HAP	-0,5	-0,6	-0,5	-0,2	-0,6	0,0	-0,5	0,2	-0,1	1,0	0,6	0,0	-0,2	0,0	0,2	0,1	0,1	-0,1	0,0	0,2	0,0	0,2	0,2	
Cu	-0,3	-0,4	-0,4	0,0	-0,3	-0,1	-0,3	0,0	-0,2	0,6	1,0	0,4	0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,2	-0,2	-0,2	0,1	-0,1	0,1	-0,1	
Zn	-0,1	0,1	-0,5	0,0	-0,1	0,1	-0,3	0,1	-0,1	0,0	0,4	1,0	0,7	-0,4	-0,3	-0,3	-0,3	-0,3	-0,2	-0,1	-0,2	-0,1	-0,2	
Cd	0,1	0,2	-0,2	-0,1	-0,2	0,3	-0,4	0,0	0,0	-0,2	0,1	0,7	1,0	-0,2	0,0	-0,1	-0,1	0,0	0,1	-0,1	0,2	0,3	0,2	
<i>gpx</i>	0,0	0,0	0,3	0,2	0,0	-0,2	0,0	-0,3	0,1	0,0	-0,1	-0,4	-0,2	1,0	0,6	0,7	0,7	0,6	0,5	-0,2	0,4	0,4	0,3	
<i>gst</i>	-0,1	-0,2	0,2	0,3	-0,3	-0,2	0,0	-0,4	0,5	0,2	-0,1	-0,3	0,0	0,6	1,0	0,8	0,8	0,5	0,4	-0,2	0,7	0,6	0,5	
<i>mxr</i>	-0,1	-0,1	0,2	0,3	0,0	-0,2	0,1	-0,3	0,3	0,1	-0,1	-0,3	-0,1	0,7	0,8	1,0	0,9	0,8	0,5	-0,3	0,4	0,4	0,5	
<i>sod</i>	-0,2	-0,1	0,1	0,3	-0,2	-0,2	0,0	-0,3	0,3	0,1	-0,2	-0,3	-0,1	0,7	0,8	0,9	1,0	0,7	0,7	-0,1	0,6	0,6	0,5	
<i>cat</i>	-0,1	-0,1	0,2	0,2	0,0	-0,2	0,1	-0,3	0,0	-0,1	-0,2	-0,3	0,0	0,6	0,5	0,8	0,7	1,0	0,7	-0,2	0,4	0,5	0,5	
<i>cyp1a1</i>	-0,1	-0,1	0,0	-0,1	-0,3	0,2	-0,2	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,2	0,1	0,5	0,4	0,5	0,7	0,7	1,0	0,1	0,4	0,5	0,5	
<i>cox1</i>	-0,2	-0,2	-0,4	-0,6	-0,4	0,5	-0,3	0,4	-0,1	0,2	0,1	-0,1	-0,1	-0,2	-0,2	-0,3	-0,1	-0,2	0,1	1,0	0,1	0,1	-0,2	
<i>mt1</i>	-0,1	-0,1	0,0	0,0	-0,4	0,1	-0,1	-0,2	0,4	0,0	-0,1	-0,2	0,2	0,4	0,7	0,4	0,6	0,4	0,4	0,4	0,1	1,0	0,8	0,5
<i>mt2</i>	-0,2	-0,3	-0,1	0,0	-0,6	0,1	-0,3	-0,1	0,2	0,2	0,1	-0,1	0,3	0,4	0,6	0,4	0,6	0,5	0,5	0,1	0,8	1,0	0,7	
<i>sodmt</i>	-0,2	-0,3	0,0	0,1	-0,3	0,0	-0,2	-0,1	0,0	0,2	-0,1	-0,2	0,2	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-0,2	0,5	0,7	1,0	

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$ et indiquent une corrélation ou une anti-corrélation significative.

En bleu sont représentées les variables passives (ou supplémentaires)



Variables et Individus

Cosinus carrés des variables :

Contributions des variables (%) :

Cosinus carrés des observations :

Contributions des observations (%) :

	F1	F2
M	0,161	0,508
L	0,110	0,670
IC	0,574	0,030
T	0,515	0,196
S	0,534	0,003
O	0,390	0,486
pH	0,660	0,043
MES	0,486	0,204
Chla	0,014	0,086
HAP	0,418	0,307
Cu Br	0,251	0,248
Zn Br	0,121	0,009
Cd Br	0,072	0,140
gpx	0,084	0,025
gst	0,020	0,044
mxr	0,082	0,093
sod	0,021	0,064
cat	0,088	0,034
cyp1a1	0,043	0,005
coxI	0,345	0,007
mt1	0,002	0,001
mt2	0,079	0,023
sodmt	0,025	0,028

	F1	F2
M	3,749	17,347
L	2,546	22,859
IC	13,322	1,038
T	11,954	6,677
S	12,394	0,088
O	9,047	16,598
pH	15,319	1,476
MES	11,295	6,969
Chla	0,336	2,934
HAP	9,717	10,468
Cu Br	5,832	8,464
Zn Br	2,809	0,295
Cd Br	1,680	4,788

	F1	F2		F1	F2
Ar J11	0,591	0,071	Ar J11	5,803	1,025
Ar O11	0,634	0,114	Ar O11	7,424	1,965
Ar Ja12	0,017	0,639	Ar Ja12	0,235	12,833
Ar M12	0,189	0,611	Ar M12	2,082	9,914
Ar S12	0,320	0,408	Ar S12	9,111	17,096
Bé J11	0,548	0,112	Bé J11	5,923	1,787
Bé O11	0,272	0,081	Bé O11	2,041	0,890
Bé Ja12	0,333	0,081	Bé Ja12	3,532	1,269
Bé S12	0,216	0,192	Bé S12	0,836	1,088
Gb J11	0,581	0,107	Gb J11	4,245	1,146
Gb O11	0,354	0,005	Gb O11	2,460	0,054
Gb Ja12	0,377	0,318	Gb Ja12	4,435	5,500
Gb M12	0,001	0,256	Gb M12	0,010	2,885
Gb S12	0,032	0,011	Gb S12	0,934	0,451
lo J11	0,145	0,456	lo J11	1,174	5,410
lo O11	0,121	0,290	lo O11	0,521	1,834
lo Ja12	0,743	0,052	lo Ja12	8,816	0,905
lo M12	0,189	0,000	lo M12	1,413	0,003
lo S12	0,001	0,061	lo S12	0,004	0,556
Lt J11	0,034	0,592	Lt J11	0,268	6,912
Lt O11	0,163	0,378	Lt O11	0,616	2,104
Lt Ja12	0,950	0,010	Lt Ja12	14,376	0,232
Lt M12	0,307	0,008	Lt M12	2,950	0,118
Ey J11	0,003	0,727	Ey J11	0,038	15,288
Ey O11	0,009	0,393	Ey O11	0,095	6,263
Ey Ja12	0,756	0,057	Ey Ja12	16,010	1,781
Ey M12	0,421	0,043	Ey M12	4,646	0,693

Les résultats correspondant aux variables supplémentaires sont affichés dans la seconde partie du tableau

Les valeurs en gras correspondent pour chaque variable au facteur pour lequel le cosinus carré est le plus grand

Les valeurs en gras correspondent pour chaque observation au facteur pour lequel le cosinus carré est le plus grand

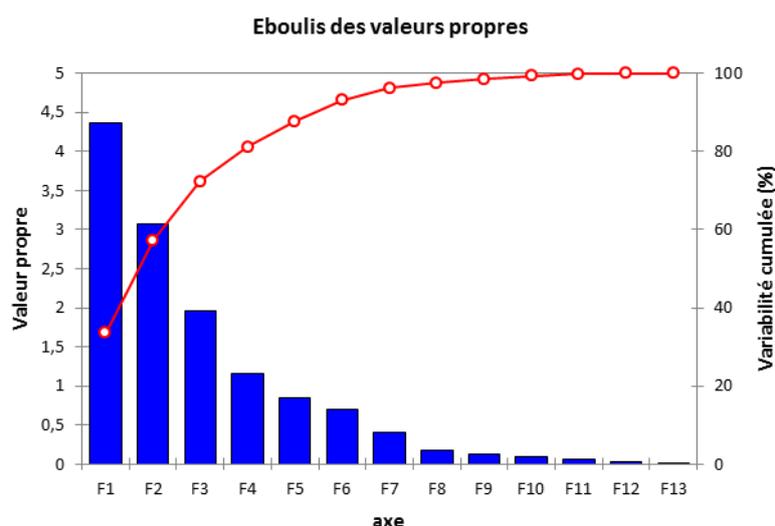
ACP – OSQUAR année 2 – Glandes digestives

Matrice des corrélations de Pearson

Variables	M	L	IC	T	S	O	pH	MES	Chla	HAP	Cu	Zn	Cd	<i>gpx</i>	<i>gst</i>	<i>mxr</i>	<i>sod</i>	<i>cat</i>	<i>cyp1a1</i>	<i>cox1</i>	<i>mt1</i>	<i>mt2</i>	<i>sodmt</i>
M	1,0	0,9	0,6	0,1	0,2	0,2	0,0	0,0	0,2	-0,5	-0,4	-0,2	0,3	-0,1	0,0	-0,1	-0,1	-0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	-0,1
L	0,9	1,0	0,3	0,0	0,2	0,2	0,0	0,1	0,2	-0,6	-0,5	-0,1	0,4	-0,1	0,1	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,2	0,0
IC	0,6	0,3	1,0	0,4	0,4	-0,3	0,5	-0,5	0,1	-0,5	-0,5	-0,5	0,0	-0,1	-0,1	-0,2	-0,3	-0,3	-0,2	0,2	0,1	0,1	-0,2
T	0,1	0,0	0,4	1,0	0,3	-0,9	0,5	-0,9	0,0	-0,2	-0,2	0,1	0,1	-0,4	-0,3	-0,4	-0,5	-0,5	-0,7	0,1	-0,3	-0,3	-0,6
S	0,2	0,2	0,4	0,3	1,0	-0,4	0,8	-0,3	0,0	-0,6	-0,2	0,1	0,3	-0,6	0,0	-0,7	-0,5	-0,5	-0,4	0,5	0,3	0,2	-0,3
O	0,2	0,2	-0,3	-0,9	-0,4	1,0	-0,5	0,8	0,3	0,0	-0,1	-0,2	0,1	0,4	0,2	0,4	0,5	0,6	0,7	-0,2	0,3	0,3	0,6
pH	0,0	0,0	0,5	0,5	0,8	-0,5	1,0	-0,5	0,1	-0,5	-0,3	-0,1	0,1	-0,5	-0,1	-0,5	-0,4	-0,5	-0,4	0,4	0,2	0,1	-0,3
MES	0,0	0,1	-0,5	-0,9	-0,3	0,8	-0,5	1,0	-0,1	0,2	0,2	0,0	-0,2	0,4	0,3	0,3	0,5	0,6	0,7	-0,1	0,4	0,4	0,6
Chla	0,2	0,2	0,1	0,0	0,0	0,3	0,1	-0,1	1,0	-0,1	-0,4	-0,5	-0,1	0,0	0,3	0,0	0,1	0,1	0,1	0,3	0,0	0,0	0,1
HAP	-0,5	-0,6	-0,5	-0,2	-0,6	0,0	-0,5	0,2	-0,1	1,0	0,6	0,1	-0,6	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	-0,2	-0,4	-0,3	0,1
Cu	-0,4	-0,5	-0,5	-0,2	-0,2	-0,1	-0,3	0,2	-0,4	0,6	1,0	0,6	-0,1	0,1	-0,1	0,1	0,1	-0,1	0,1	-0,2	-0,3	-0,3	-0,1
Zn	-0,2	-0,1	-0,5	0,1	0,1	-0,2	-0,1	0,0	-0,5	0,1	0,6	1,0	0,4	-0,2	-0,3	-0,1	-0,2	-0,2	-0,1	-0,2	-0,2	-0,2	-0,2
Cd	0,3	0,4	0,0	0,1	0,3	0,1	0,1	-0,2	-0,1	-0,6	-0,1	0,4	1,0	-0,3	-0,4	-0,3	-0,4	-0,3	-0,2	-0,3	-0,1	-0,1	-0,3
<i>gpx</i>	-0,1	-0,1	-0,1	-0,4	-0,6	0,4	-0,5	0,4	0,0	0,3	0,1	-0,2	-0,3	1,0	0,2	0,9	0,6	0,6	0,6	-0,4	-0,1	-0,1	0,5
<i>gst</i>	0,0	0,1	-0,1	-0,3	0,0	0,2	-0,1	0,3	0,3	0,2	-0,1	-0,3	-0,4	0,2	1,0	0,2	0,6	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5
<i>mxr</i>	-0,1	-0,1	-0,2	-0,4	-0,7	0,4	-0,5	0,3	0,0	0,3	0,1	-0,1	-0,3	0,9	0,2	1,0	0,7	0,6	0,6	-0,4	-0,1	-0,1	0,5
<i>sod</i>	-0,1	0,0	-0,3	-0,5	-0,5	0,5	-0,4	0,5	0,1	0,3	0,1	-0,2	-0,4	0,6	0,6	0,7	1,0	0,9	0,7	-0,1	0,2	0,2	0,7
<i>cat</i>	-0,1	0,0	-0,3	-0,5	-0,5	0,6	-0,5	0,6	0,1	0,2	-0,1	-0,2	-0,3	0,6	0,4	0,6	0,9	1,0	0,6	-0,3	0,2	0,2	0,7
<i>cyp1a1</i>	0,0	0,0	-0,2	-0,7	-0,4	0,7	-0,4	0,7	0,1	0,1	0,1	-0,1	-0,2	0,6	0,5	0,6	0,7	0,6	1,0	0,0	0,4	0,5	0,8
<i>cox1</i>	0,0	0,1	0,2	0,1	0,5	-0,2	0,4	-0,1	0,3	-0,2	-0,2	-0,2	-0,3	-0,4	0,5	-0,4	-0,1	-0,3	0,0	1,0	0,5	0,5	0,0
<i>mt1</i>	0,1	0,2	0,1	-0,3	0,3	0,3	0,2	0,4	0,0	-0,4	-0,3	-0,2	-0,1	-0,1	0,4	-0,1	0,2	0,2	0,4	0,5	1,0	0,9	0,5
<i>mt2</i>	0,1	0,2	0,1	-0,3	0,2	0,3	0,1	0,4	0,0	-0,3	-0,3	-0,2	-0,1	-0,1	0,4	-0,1	0,2	0,2	0,5	0,5	0,9	1,0	0,5
<i>sodmt</i>	-0,1	0,0	-0,2	-0,6	-0,3	0,6	-0,3	0,6	0,1	0,1	-0,1	-0,2	-0,3	0,5	0,5	0,5	0,7	0,7	0,8	0,0	0,5	0,5	1,0

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$ et indiquent une corrélation ou une anti-corrélation significative.

En bleu sont représentées les variables passives (ou supplémentaires)



Variables et Individus

Cosinus carrés des variables :

	F1	F2
M	0,277	0,338
L	0,255	0,429
IC	0,566	0,012
T	0,429	0,368
S	0,491	0,026
O	0,205	0,697
pH	0,505	0,139
MES	0,417	0,317
Chla	0,041	0,158
HAP	0,598	0,110
Cu Gd	0,379	0,242
Zn Gd	0,067	0,220
Cd Gd	0,138	0,009
<i>gpx</i>	0,346	0,138
<i>gst</i>	0,064	0,176
<i>mxr</i>	0,379	0,111
<i>sod</i>	0,476	0,280
<i>cat</i>	0,309	0,313
<i>cyp1a1</i>	0,341	0,420
<i>cox1</i>	0,173	0,001
<i>mt1</i>	0,024	0,180
<i>mt2</i>	0,005	0,251
<i>sodmt</i>	0,232	0,336

Contributions des variables (%) :

	F1	F2
M	6,348	11,027
L	5,830	13,993
IC	12,949	0,379
T	9,817	12,012
S	11,234	0,843
O	4,697	22,730
pH	11,553	4,545
MES	9,537	10,331
Chla	0,950	5,143
HAP	13,700	3,599
Cu Gd	8,674	7,902
Zn Gd	1,544	7,191
Cd Gd	3,168	0,305

Cosinus carrés des observations :

	F1	F2
Ar J11	0,483	0,145
Ar O11	0,622	0,087
Ar Ja12	0,003	0,789
Ar M12	0,401	0,457
Ar S12	0,420	0,194
Bé J11	0,410	0,182
Bé O11	0,142	0,028
Bé Ja12	0,404	0,244
Bé M12	0,191	0,376
Bé S12	0,348	0,062
Gb J11	0,417	0,289
Gb O11	0,290	0,007
Gb Ja12	0,264	0,365
Gb M12	0,168	0,256
Gb S12	0,004	0,043
Io J11	0,009	0,541
Io O11	0,026	0,171
Io Ja12	0,790	0,116
Io M12	0,130	0,040
Io S12	0,018	0,013
Lt J11	0,050	0,616
Lt O11	0,005	0,420
Lt Ja12	0,875	0,078
Lt M12	0,253	0,000
Ey J11	0,032	0,783
Ey O11	0,003	0,334
Ey Ja12	0,873	0,004
Ey M12	0,324	0,002

Contributions des observations (%) :

	F1	F2
Ar J11	5,072	2,175
Ar O11	6,746	1,349
Ar Ja12	0,039	15,610
Ar M12	4,393	7,135
Ar S12	11,682	7,674
Bé J11	4,404	2,791
Bé O11	1,081	0,301
Bé Ja12	3,938	3,387
Bé M12	0,665	1,868
Bé S12	1,589	0,404
Gb J11	2,891	2,853
Gb O11	1,853	0,062
Gb Ja12	2,338	4,607
Gb M12	0,900	1,953
Gb S12	0,086	1,452
Io J11	0,065	5,811
Io O11	0,117	1,085
Io Ja12	9,689	2,033
Io M12	1,090	0,482
Io S12	0,094	0,098
Lt J11	0,985	17,296
Lt O11	0,021	2,466
Lt Ja12	12,560	1,595
Lt M12	1,905	0,000
Ey J11	0,333	11,491
Ey O11	0,024	3,832
Ey Ja12	22,711	0,166
Ey M12	2,729	0,023

Les résultats correspondant aux variables supplémentaires sont affichés dans la seconde partie du tableau

Les valeurs en gras correspondent pour chaque variable au facteur pour lequel le cosinus carré est le plus grand

Les valeurs en gras correspondent pour chaque observation au facteur pour lequel le cosinus carré est le plus grand

9. Données de l'expérience *in-situ* « Été 2012 »

Paramètres de croissance - Eté 2012			Masse fraîche (g)		Longueur de coquille (cm)		Indice de condition	
			Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Diploïdes	Ar	Mai 12	2,4	1,2	8,5	0,7	8,3	2,1
		Juin 12	5,5	1,1	7,9	0,8	18,7	2,8
		Juil. 12	6,6	2,0	9,1	0,7	18,2	3,2
		Aout 12	6,3	1,4	9,3	1,5	21,1	5,5
		Sep.12	7,5	2,0	9,4	1,3	19,8	5,6
	Io	Mai 12	2,4	1,2	8,5	0,7	8,3	2,1
		Juin 12	4,8	1,0	9,2	0,7	11,3	2,6
		Juil. 12	5,5	0,5	8,1	0,4	23,1	6,6
		Aout 12	5,0	0,7	8,8	1,0	17,5	4,5
		Sep.12	6,6	0,9	10,2	1,0	16,1	1,7
	Lt	Mai 12	2,4	1,2	8,5	0,7	8,3	2,1
		Juin 12	3,0	0,6	8,7	0,7	11,2	1,9
		Juil. 12	5,6	0,6	8,9	0,8	22,7	3,0
		Aout 12	3,0	0,8	8,3	0,6	10,5	1,7
		Sep.12	4,0	0,9	8,4	1,4	11,5	1,0
Triploïdes	Ar	Mai 12	4,7	0,7	8,2	0,7	11,7	0,6
		Juin 12	6,2	0,6	9,3	0,6	15,5	1,7
		Juil. 12	7,7	1,4	9,7	0,6	16,9	3,5
		Aout 12	8,2	1,4	9,7	0,9	14,3	1,4
		Sep.12	8,2	2,2	10,2	0,6	13,4	1,3
	Io	Mai 12	4,7	0,7	8,2	0,7	11,7	0,6
		Juin 12	5,8	0,7	8,8	0,7	14,4	1,1
		Juil. 12	6,2	0,9	9,2	0,5	14,2	1,9
		Aout 12	7,8	1,5	9,6	0,5	15,2	3,6
		Sep.12	9,1	0,7	10,3	0,8	15,7	1,5
	Lt	Mai 12	4,7	0,7	8,2	0,7	11,7	0,6
		Juin 12	5,3	1,0	8,8	0,4	12,4	2,1
		Juil. 12	5,8	0,9	8,5	0,3	12,9	1,9
		Aout 12	6,9	1,1	9,1	0,5	13,0	1,9
		Sep.12	5,1	1,1	9,3	0,7	11,9	2,8

Huîtres cultivées ng/g, ps	Mai 12		Juin 12						Juillet 12					
	2n	3n	2n			3n			2n			3n		
	/	/	Ar	Io	Lt									
Naphtalène	0,7	0,0	0,4	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	1,0	1,7	0,0	0,0	0,0
Acénaphthylène	0,4	0,0	0,4	0,9	0,7	0,0	0,0	1,1	0,2	1,4	0,0	0,0	0,7	0,9
Acénaphthène	0,8	0,0	1,0	0,9	0,9	0,0	0,0	5,2	0,4	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0
Fluorène	0,3	0,6	0,5	0,6	0,7	1,5	1,6	1,1	1,6	2,0	0,0	0,7	2,4	0,3
Dibenzothiophène	0,2	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0
Phénanthrène	4,4	6,4	2,1	5,6	3,7	3,4	6,4	5,6	2,6	5,7	5,3	2,9	4,7	1,8
Anthracène	0,4	1,0	0,4	0,8	0,5	0,5	1,2	2,2	0,2	0,5	0,5	0,6	1,1	1,2
Fluoranthène	23,0	32,7	10,5	34,0	28,0	8,9	37,8	38,6	6,7	28,0	27,4	8,8	25,5	23,4
Pyrène	19,6	29,8	4,5	31,4	28,1	5,2	30,5	32,6	3,6	24,5	25,3	4,5	21,0	23,2
2,1 Benzonaphtothiophène	0,7	1,2	0,6	2,6	2,5	1,0	3,1	3,9	0,4	1,5	2,0	0,9	1,4	1,7
Benzo(a)anthracène	7,7	9,8	3,0	13,8	13,2	2,0	13,5	14,9	3,1	7,6	8,7	6,3	8,9	11,4
Triphène + Chrysène	9,2	13,9	6,1	20,7	17,8	6,1	24,9	28,6	3,6	12,7	13,9	5,3	18,8	20,6
Benzo(b,j,k)fluoranthène	18,8	51,7	14,1	61,4	58,9	19,7	85,9	90,2	10,4	59,6	67,8	16,3	71,0	83,5
Benzo(a)fluoranthène	0,5	0,0	2,2	1,3	1,5	0,0	1,8	1,8	0,0	1,1	0,9	0,0	1,1	1,7
Benzo(e)pyrène	8,2	16,0	4,0	19,2	18,2	8,2	29,0	28,8	3,0	16,3	21,2	6,4	22,1	23,6
Benzo(a)pyrène	1,0	0,0	1,9	2,7	5,4	1,8	3,9	3,8	0,2	1,4	1,1	0,0	0,9	1,6
Pérylène	1,6	0,0	4,6	6,2	8,1	1,9	2,7	3,0	3,4	4,6	4,5	0,0	1,2	1,9
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	3,5	2,3	1,6	8,8	7,5	2,1	11,0	10,4	1,3	6,0	7,4	2,5	6,7	8,2
Dibenzo(ah,ac)anthracène	0,0	0,0	0,0	1,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Benzo(g,h,i)perylène	4,1	7,2	1,6	7,0	7,2	4,4	11,4	11,9	4,4	5,5	6,4	2,6	8,4	9,5
Somme 16 HAP	93,8	155,4	48,1	190,1	174,5	55,6	228,1	246,1	38,4	159,2	165,5	50,4	170,2	185,7
Somme HAP	105,0	172,7	59,5	219,6	204,9	66,5	264,6	283,6	45,3	183,0	194,2	57,7	196,0	214,5
2MN	0,4	0,0	0,0	0,7	0,2	0,0	0,0	0,0	0,3	1,0	1,4	0,0	0,0	0,0
1MN	0,2	0,0	0,0	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,5	0,6	0,0	0,0	0,0
4 MDBT	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3+2 MDBT	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1 MDBT	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3 MP	1,5	1,9	1,3	2,9	2,4	0,9	2,6	2,7	1,4	3,3	3,1	1,5	2,9	1,9
2 MP	1,8	2,9	1,6	3,6	3,2	0,6	3,5	3,5	1,4	3,8	3,1	1,8	3,1	2,2
2 MA	0,0	0,0	0,0	0,5	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9 MP+1 MA	1,7	5,9	1,2	5,0	2,1	0,6	2,8	3,1	1,2	0,0	0,0	1,1	3,0	2,3
1 MP	1,5	3,0	1,1	3,3	2,0	0,7	2,4	3,1	0,9	0,0	0,0	1,1	2,5	1,7
∑MCHRYS	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Huîtres cultivées ng/g, ps	Aout 12						Septembre 12					
	2n			3n			2n			3n		
	Ar	Io	Lt	Ar	Io	Lt	Ar	Io	Lt	Ar	Io	Lt
Naphtalène	0,7	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,6	0,0	0,0	0,0
Acénaphthylène	0,4	1,0	0,9	0,4	0,9	0,8	0,0	1,2	1,1	0,6	0,9	1,1
Acénaphthène	1,2	1,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	2,1	1,2	0,0	0,0	0,0
Fluorène	1,8	1,4	1,2	1,4	1,5	1,1	9,4	2,8	2,5	4,0	5,9	5,7
Dibenzothiophène	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
Phénanthrène	3,9	3,0	3,3	1,5	5,0	1,1	3,9	5,7	3,9	1,4	5,5	3,5
Anthracène	0,5	0,7	0,5	0,7	1,0	0,8	0,0	0,6	0,6	0,8	1,0	0,9
Fluoranthène	14,7	27,4	25,2	7,4	33,0	28,5	14,2	30,2	27,9	0,0	30,9	31,8
Pyrène	10,4	29,5	25,7	7,0	36,3	32,9	10,2	29,3	27,6	2,0	30,1	34,0
2,1 Benzonaphthothiophène	1,1	2,1	2,4	0,0	1,6	2,3	2,0	2,2	2,4	0,0	1,8	3,4
Benzo(a)anthracène	4,8	14,2	12,4	3,7	14,0	11,9	6,1	10,4	12,6	9,1	12,7	13,8
Triphénylène + Chrysène	9,2	17,5	15,3	6,2	24,4	23,1	10,0	17,4	17,2	0,0	24,1	28,9
Benzo(b,j,k)fluoranthène	19,8	42,6	67,4	28,8	93,5	95,7	23,7	72,3	65,9	23,9	85,3	101,2
Benzo(a)fluoranthène	0,9	1,6	2,0	0,9	2,6	2,9	2,7	1,6	2,3	0,0	2,1	2,3
Benzo(e)pyrène	6,1	11,6	18,2	8,9	29,3	28,3	11,7	20,8	18,9	7,3	30,2	30,6
Benzo(a)pyrène	1,3	7,5	7,4	1,8	6,1	5,6	2,0	3,7	7,7	1,7	2,0	1,9
Perylène	8,9	7,6	8,8	3,1	5,0	4,3	2,4	8,9	9,9	0,0	2,2	2,9
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	2,7	10,4	11,0	3,8	11,1	8,9	2,0	10,3	11,5	2,6	8,0	9,6
Dibenzo(ah,ac)anthracène	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	3,3	0,0	2,2	2,0	0,0	0,0	0,0
Benzo(g,h,i)perylène	3,4	9,4	10,1	4,7	11,3	11,9	5,9	9,1	9,8	3,3	9,6	10,6
Somme 16 HAP	74,8	167,9	181,5	67,3	238,1	225,6	87,4	198,1	192,2	49,4	215,8	243,0
Somme HAP	91,8	190,9	213,0	80,2	276,7	263,4	106,2	231,9	225,7	56,7	252,1	282,3
2MN	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0
1MN	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
4 MDBT	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,0	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3+2 MDBT	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1 MDBT	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3 MP	2,9	2,0	1,7	2,4	3,2	1,8	2,3	3,4	2,2	1,2	3,5	3,1
2 MP	3,3	2,8	2,4	1,7	3,9	2,6	2,0	3,2	2,8	0,0	4,0	3,3
2 MA	0,6	0,9	0,3	4,8	0,7	0,8	0,0	0,3	0,3	0,0	0,6	0,4
9 MP+1 MA	2,6	2,0	1,5	0,0	3,2	1,8	2,3	3,7	1,8	0,4	3,2	2,6
1 MP	2,0	1,5	1,2	1,3	2,1	1,3	1,4	2,4	1,1	0,3	2,1	1,6
ΣMCHRYS	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Sédiments ng/g, ps	Juin 12			Juillet 12			Aout 12		
	Ar	Io	Lt	Ar	Io	Lt	Ar	Io	Lt
Naphtalène	1,5	0,2	6,5	0,0	0,9	1,8	0,0	0,2	1,5
Acénaphthylène	1,8	0,3	18,9	0,0	1,3	1,8	0,0	3,8	6,5
Acénaphthène	0,5	0,1	6,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	11,7
Fluorène	0,9	0,6	22,1	0,0	2,4	2,0	0,0	5,6	4,4
Dibenzothiophène	0,6	0,4	13,6	0,0	1,9	1,3	0,0	3,8	5,9
Phénanthrène	7,4	5,3	106,4	0,0	23,7	18,4	0,1	36,7	60,6
Anthracène	1,8	0,6	41,2	0,0	13,9	5,7	0,0	7,5	29,1
Fluoranthène	24,9	9,0	211,3	0,0	49,2	50,1	0,1	56,3	205,2
Pyrène	24,7	7,0	175,5	0,0	43,5	42,2	0,1	40,7	174,6
2,1 Benzonaphthothiophène	3,3	0,9	29,3	0,0	4,2	6,4	0,0	8,8	35,6
Benzo(a)anthracène	19,6	5,6	239,1	0,0	24,8	32,1	0,0	36,0	144,0
Triphène + Chrysène	15,9	3,8	101,8	0,0	24,2	34,4	0,0	28,5	138,1
Benzo(b,j,k)fluoranthène	33,8	8,2	240,6	0,1	44,8	67,6	0,1	45,6	217,7
Benzo(a)fluoranthène	3,8	0,8	48,0	0,0	6,7	9,3	0,0	5,9	41,6
Benzo(e)pyrène	12,3	2,6	82,0	0,0	17,9	27,2	0,0	14,4	84,0
Benzo(a)pyrène	19,5	3,9	135,9	0,1	32,5	42,6	0,1	25,1	143,5
Perylène	14,3	2,1	102,0	0,0	8,4	12,9	0,0	12,5	35,8
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	17,2	5,9	201,5	0,1	21,6	31,3	0,0	17,6	83,3
Dibenzo(ah,ac)anthracène	3,7	0,8	19,5	0,0	4,8	9,2	0,0	6,2	37,8
Benzo(g,h,i)perylène	13,1	2,7	91,9	0,1	21,2	29,2	0,0	12,7	73,2
Somme 16 HAP	186,2	53,9	1618,2	0,3	308,6	368,4	0,6	323,4	1331,1
Somme HAP	220,6	60,8	1893,1	0,4	347,6	425,6	0,6	368,9	1534,0
2MN	1,1	0,1	3,4	0,0	0,3	0,7	0,0	0,0	0,0
1MN	0,6	0,0	3,3	0,0	0,2	0,4	0,0	0,0	0,0
4 MDBT	0,4	0,1	2,8	0,0	0,3	0,4	0,0	0,8	5,2
3+2 MDBT	0,3	0,1	4,1	0,0	0,4	0,4	0,0	0,9	5,3
1 MDBT	0,1	0,0	1,3	0,0	0,2	0,1	0,0	0,1	2,0
3 MP	1,9	0,8	19,3	0,0	2,5	3,2	0,0	5,2	21,7
2 MP	2,2	1,0	23,7	0,0	3,4	4,2	0,0	6,2	25,2
2 MA	0,7	0,2	15,3	0,0	1,9	1,6	0,0	1,4	13,5
9 MP+1 MA	2,3	0,5	15,6	0,0	2,7	3,4	0,0	2,8	26,1
1 MP	1,2	0,5	14,6	0,0	1,9	2,2	0,0	2,8	14,7
ΣMCHRYS	0,0	1,6	92,5	0,0	11,2	21,3	0,0	14,6	134,0

Microphytobenthos ng/g, ps	Mai 2012					Septembre 2012				
	Ar	Bé	Gb	Io	Lt	Ar	Bé	Gb	Io	Lt
Naphtalène	4,6	10,9	6,8	10,3	8,1	6,3	5,2	3,0	3,1	15,6
Acénaphthylène	2,4	8,2	4,8	8,1	7,2	6,1	7,2	1,8	3,2	34,9
Acénaphthène	0,7	3,4	1,9	3,5	2,9	1,3	10,7	0,6	0,8	4,9
Fluorène	1,8	8,0	5,4	7,8	7,7	3,1	11,6	1,8	1,6	17,4
Dibenzothiophène	1,1	3,9	3,1	3,8	3,5	2,3	5,5	0,8	1,4	16,9
Phénanthrène	15,3	43,4	32,9	31,3	35,0	30,3	80,8	10,5	18,3	174,2
Anthracène	2,2	7,2	6,3	5,2	5,8	6,0	9,8	1,2	3,4	68,7
Fluoranthène	39,9	94,5	73,8	82,0	82,1	100,5	146,1	24,7	57,7	505,8
Pyrène	48,4	117,0	89,6	111,4	109,6	124,6	167,8	30,0	69,8	635,9
2,1 Benzonaphtothiophène	4,3	9,0	7,5	9,4	9,2	11,8	18,2	2,4	5,8	69,3
Benzo(a)anthracène	25,4	59,3	44,3	54,1	50,3	75,0	112,0	14,7	34,1	442,1
Triphène + Chrysène	27,4	75,0	50,9	69,5	63,9	81,5	111,8	19,5	42,3	389,5
Benzo(b,j,k)fluoranthène	62,8	157,8	110,0	174,9	159,2	153,6	45,4	40,1	84,7	702,8
Benzo(a)fluoranthène	4,5	12,6	9,5	15,4	10,8	15,8	209,6	3,1	6,6	94,4
Benzo(e)pyrène	18,7	52,2	32,5	51,1	45,0	47,2	57,1	16,4	24,8	206,8
Benzo(a)pyrène	24,3	53,1	40,2	61,1	52,5	65,2	78,7	12,2	33,6	345,6
Pérylène	18,8	47,1	32,7	47,0	37,5	44,4	45,0	11,4	15,8	203,0
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	30,6	88,0	60,6	102,4	87,9	83,5	99,7	22,7	50,5	433,6
Dibenzo(ah,ac)anthracène	5,4	10,6	6,5	11,0	11,1	13,5	18,2	2,9	6,3	74,0
Benzo(g,h,i)perylène	20,2	64,1	37,2	62,4	54,0	54,4	61,5	17,2	28,6	254,5
Somme 16 HAP	311,3	800,5	571,1	795,1	737,2	804,8	966,2	203,0	438,1	4099,5
Somme HAP	358,8	925,2	656,4	921,8	843,0	926,3	1301,8	237,2	492,6	4689,9
2MN	3,5	10,9	5,6	10,1	7,0	5,3	5,1	2,8	2,1	6,2
1MN										
4 MDBT	0,6	2,8	2,6	2,7	2,9	1,4	1,9	0,6	0,6	6,2
3+2 MDBT										
1 MDBT	0,5	0,7	0,7	0,6	0,8	0,7	0,5	0,3	0,2	2,7
3 MP	5,0	9,6	10,2	8,1	8,6	7,9	13,0	2,4	4,1	42,1
2 MP	4,8	12,5	11,5	10,6	11,2	9,9	16,5	3,2	5,4	48,8
2 MA	0,8	2,3	5,2	2,0	2,0	3,2	3,2	0,6	1,2	26,5
9 MP+1 MA	2,9	8,7	9,7	7,7	8,0	7,3	9,4	2,2	4,0	37,5
1 MP	2,8	7,6	6,8	6,4	6,7	5,9	8,3	1,8	3,0	29,1
∑MCHRYS	12,2	27,5	21,1	26,5	24,8	29,5	3,5	5,7	0,0	174,4

Eau ng/L	Juin 12			Juillet 12			Aout 12			Septembre 12		
	Ar	Io	Lt	Ar	Io	Lt	Ar	Io	Lt	Ar	Io	Lt
Naphtalène	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	1,0
Acénaphthylène	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Acénaphthène	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fluorène	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
Dibenzothiophène	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
Phénanthrène	0,9	1,6	2,3	1,5	1,2	0,9	1,0	1,5	1,2	1,2	1,1	1,2
Anthracène	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fluoranthène	0,6	1,0	1,6	0,5	1,8	1,3	0,6	1,2	1,4	1,4	0,9	1,6
Pyrène	0,6	0,8	1,6	0,4	2,2	1,3	0,5	1,4	1,6	1,6	0,9	1,9
2,1 Benzonaphthothiophène	0,1	0,0	0,1	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,2
Benzo(a)anthracène	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Triphène + Chrysène	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Benzo(b,j,k)fluoranthène	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Benzo(a)fluoranthène	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Benzo(e)pyrène	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Benzo(a)pyrène	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Perylène	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Dibenzo(ah,ac)anthracène	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Benzo(g,h,i)perylène	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Somme 16 HAP	2,2	3,4	5,4	2,3	6,6	3,5	2,1	4,9	4,2	4,2	3,9	5,7
Somme HAP	2,5	3,6	5,8	2,5	7,1	3,6	2,1	5,0	4,3	4,6	4,1	6,0

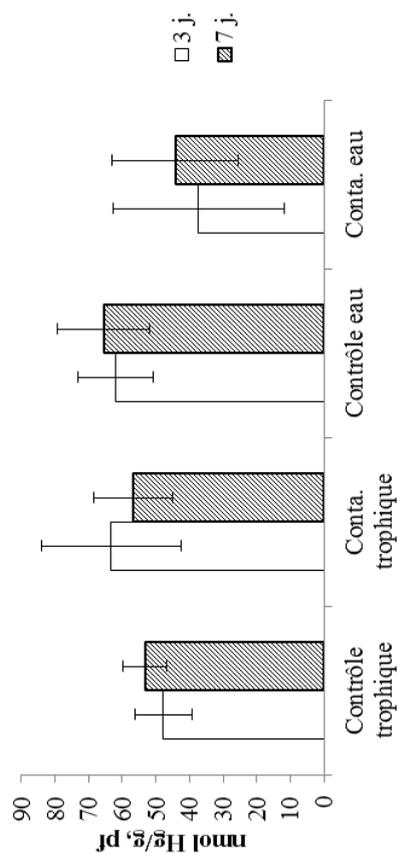
Métallothionéines			Branchies (nmol Hg/g, pf)		Glande digestive (nmol Hg/g, pf)	
			Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Diploïde	Ar	Jun. 12	13,7	6,6	52,6	8,5
		Jul. 12	14,3	4,9	64,2	14,6
		Aug. 12	4,3	2,4	31,3	8,2
		Sep. 12	6,4	1,9	31,3	6,2
	Io	Jun. 12	12,4	4,1	39,8	8,0
		Jul. 12	21,7	8,3	62,7	18,9
		Aug. 12	3,3	1,0	19,0	4,9
		Sep. 12	8,8	4,1	33,3	13,3
	Lt	Jun. 12	2,1	1,4	12,0	9,1
		Jul. 12	18,6	12,0	48,6	5,5
		Aug. 12	2,3	1,6	19,9	10,7
		Sep. 12	6,5	1,8	30,9	3,4
Triploïde	Ar	Jun. 12	13,7	4,4	57,2	4,7
		Jul. 12	20,8	2,4	43,1	10,5
		Aug. 12	3,5	2,5	22,5	7,8
		Sep. 12	5,3	2,0	30,1	10,2
	Io	Jun. 12	13,5	5,1	45,3	13,9
		Jul. 12	17,7	4,4	42,2	7,8
		Aug. 12	3,4	2,8	24,1	4,1
		Sep. 12	12,0	7,0	33,7	3,3
	Lt	Jun. 12	2,0	1,2	22,9	11,0
		Jul. 12	15,2	7,1	47,3	6,4
		Aug. 12	10,7	10,7	28,3	6,7
		Sep. 12	9,0	0,8	29,8	9,0

Expressions géniques relatives OSQUAR 2		gpx		gst		mrx		sod		cat		cyp11a1		cox1		mt1		mt2		sodmt		
		Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	
Diptères	Ar	Jun. 12	0.14	0.03	0.23	0.11	8.40E-02	3.60E-02	1.10E-01	2.50E-02	9.60E-02	4.70E-02	0.23	0.07	6	1	1.13	0.74	1.2	0.7	2.90E-01	5.90E-02
		Jul. 12	0.19	0.05	0.05	0.01	1.60E-02	2.80E-03	1.10E-01	2.20E-02	1.70E-02	4.10E-03	0.3	0.08	9	1	0.54	0.09	0.9	0.1	7.80E-02	1.60E-02
		Aug. 12	0.12	0.03	0.05	0.03	6.30E-02	5.50E-02	6.10E-02	2.50E-02	6.30E-02	5.00E-02	0.13	0.04	7	1	1.1	0.34	1.3	0.5	7.00E-02	2.50E-02
		Sep. 12	0.31	0.28	0.54	0.24	2.10E-01	6.70E-02	2.70E-01	9.60E-02	6.20E-02	4.80E-02	0.22	0.07	6	3	2.3	1.86	4.5	4	2.70E-01	4.70E-02
	Io	Jun. 12	1.78	1.14	0.97	0.47	6.90E-01	2.40E-01	8.30E-01	4.10E-01	6.40E-01	3.30E-01	0.69	0.37	3	1	1.21	0.81	1.4	0.8	8.00E-01	5.30E-01
		Jul. 12	0.34	0.16	0.52	0.21	2.20E-01	9.60E-02	2.50E-01	1.70E-01	1.80E-01	8.90E-02	0.24	0.07	2	1	1.28	0.36	1.7	0.5	5.70E-01	1.20E-01
		Aug. 12	0.25	0.15	0.18	0.11	2.20E-01	1.50E-01	9.20E-02	1.70E-02	1.50E-01	8.90E-02	0.22	0.1	6	1	1.03	0.21	0.8	0.2	2.40E-01	1.20E-01
		Sep. 12	0.04	0.01	0.36	0.24	1.50E-02	5.70E-03	2.10E-01	3.10E-01	3.10E-01	2.70E-01	0.38	0.19	5	3	0.67	0.29	1	0.6	4.60E-01	2.60E-01
	Lt	Jun. 12	1.02	0.25	0.73	0.2	6.80E-01	2.10E-01	5.10E-01	1.40E-01	6.20E-01	2.20E-01	0.63	0.17	3	0	0.67	0.24	1	0.6	7.60E-01	2.40E-01
		Jul. 12	0.08	0.02	0.12	0.08	3.60E-02	2.70E-02	2.40E-01	1.30E-01	9.80E-02	7.50E-02	0.22	0.09	7	2	0.97	0.74	1.9	1.6	1.60E-01	5.10E-02
		Aug. 12	0.32	0.15	0.78	0.62	6.90E-02	4.40E-02	3.10E-01	8.00E-02	2.40E-01	5.80E-02	0.53	0.31	1	2.3	2.3	1.91	5.5	5.2	3.30E-01	1.60E-01
		Sep. 12	0.24	0.12	0.24	0.15	6.40E-02	2.20E-02	1.20E-01	5.70E-02	6.20E-02	2.00E-02	0.11	0.04	4	1	0.28	0.14	0.3	0.2	7.10E-02	2.60E-02
Triptères	Ar	Jun. 12	0.11	0.04	0.07	0.07	5.40E-02	3.10E-02	8.90E-02	5.30E-02	7.40E-02	4.80E-02	0.26	0.17	4	1	0.24	0.1	0.3	0.1	3.90E-01	2.00E-01
		Jul. 12	0.11	0.03	0.21	0.07	1.80E-02	9.50E-03	8.30E-02	1.50E-02	6.50E-02	3.20E-02	0.25	0.05	9	4	0.7	0.08	0.9	0.2	2.60E-01	7.10E-02
		Aug. 12	0.16	0.04	0.12	0.04	4.10E-02	1.30E-02	9.80E-02	2.30E-02	5.40E-02	2.60E-02	0.2	0.04	7	1	0.68	0.18	1.2	0.5	1.50E-01	5.60E-02
		Sep. 12	0.48	0.03	0.31	0.05	2.60E-01	8.10E-02	3.00E-01	8.70E-02	2.50E-01	9.30E-02	0.42	0.15	8	1	1.94	0.6	2.4	0.8	3.30E-01	6.40E-02
	q	Jun. 12	0.46	0.11	0.75	0.21	6.90E-01	3.40E-01	3.90E-01	3.60E-02	7.90E-01	2.60E-01	0.72	0.08	4	1	0.85	0.2	0.9	0.2	4.00E-01	8.50E-02
		Jul. 12	1.17	0.23	1.89	0.69	2.00E+00	6.40E-01	2.50E+00	1.00E+00	2.80E+00	1.30E+00	3.78	1.54	17	11	4.38	1.67	3.8	1.8	4.40E+00	2.70E-02
		Aug. 12	0.5	0.27	0.9	0.45	7.10E-01	4.90E-01	1.30E+00	8.10E-01	4.00E-01	1.90E-01	0.7	0.35	7	2	1.42	0.4	1.8	0.6	3.10E-01	5.70E-02
		Sep. 12	0.2	0.05	0.08	0.03	1.20E-01	1.20E-01	1.20E-01	3.20E-02	4.20E-03	7.80E-04	0.14	0.05	15	4	5.2	4.36	22.1	21	5.50E+00	5.40E-01
	Lt	Jun. 12	0.6	0.2	1.34	0.59	1.80E+00	7.40E-01	1.20E+00	4.90E-01	1.20E+00	4.50E-01	0.66	0.26	9	3	1.43	0.28	1	0.3	7.60E-01	3.20E-01
		Jul. 12	0.19	0.08	0.19	0.06	7.10E-02	4.20E-02	6.40E-02	2.30E-02	1.70E-01	1.00E-01	0.11	0.03	6	2	0.8	0.43	0.6	0.4	2.80E-01	8.40E-02
		Aug. 12	0.13	0.08	0.18	0.09	6.70E-02	3.40E-02	1.40E-01	5.20E-02	1.80E-01	1.20E-01	0.24	0.13	4	1	0.23	0.05	0.2	0.1	2.10E-01	1.10E-01
		Sep. 12	0.07	0.01	0.11	0.06	5.90E-03	1.90E-03	7.30E-02	2.40E-02	4.30E-02	1.70E-02	0.07	0.02	7	2	1.96	1.56	2.9	2.5	7.40E-02	2.00E-02

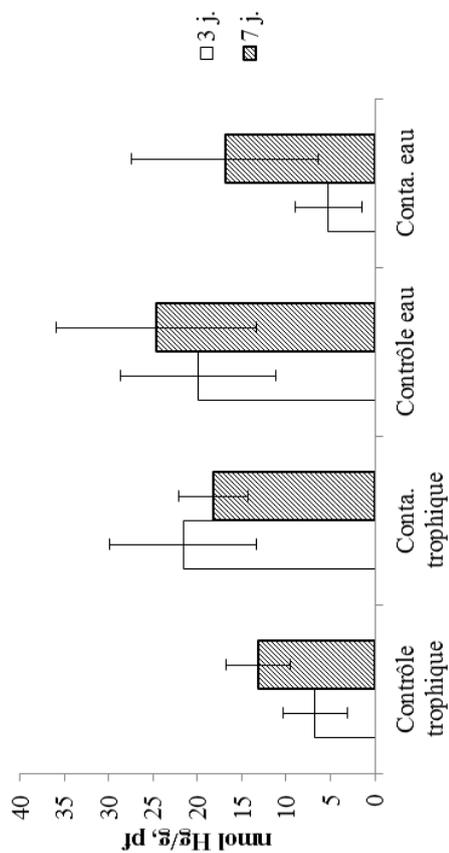
Expressions géniques relatives Glande digestive OSQUAR 2		gpx		gst		mrx		sod		cat		cyp11a1		cox1		mt1		mt2		sodmt		
		Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	Moy.	ES	
Diptères	Ar	Jun. 12	0.11	0.04	0.38	0.19	4.40E-02	2.10E-02	1.20E-01	6.20E-02	8.40E-02	5.80E-02	0.48	0.25	25	10	7.93	4.84	6.7	3.2	3.00E-01	1.20E-01
		Jul. 12	0.08	0.01	0.22	0.08	1.60E-02	7.50E-03	6.00E-02	3.10E-02	1.00E-02	3.30E-03	0.4	0.02	23	10	2.46	0.53	9.1	5.4	1.60E-01	6.00E-02
		Aug. 12	0.22	0.09	0.63	0.23	1.10E-01	6.60E-02	5.50E-01	2.80E-01	3.30E-01	1.70E-01	0.48	0.2	26	7	5.4	2.3	5.1	2.1	5.70E-01	1.50E-01
		Sep. 12	0.39	0.24	1.42	0.54	8.60E-01	4.80E-01	7.00E-01	2.70E-01	3.60E-01	2.40E-01	0.72	0.28	7	2	2.9	1.84	6.1	4.9	5.90E-01	1.80E-01
	Io	Jun. 12	0.34	0.06	0.4	0.11	1.20E-01	4.10E-02	2.90E-01	1.40E-01	1.20E-01	3.40E-02	0.21	0.05	16	4	1.17	0.33	1.7	0.5	2.10E-01	3.50E-02
		Jul. 12	0.05	0.02	0.47	0.13	8.30E-02	6.40E-02	1.60E-01	1.10E-01	3.70E-02	1.40E-02	0.09	0.05	12	5	14.23	13.24	30.7	26.7	6.40E-01	1.30E-01
		Aug. 12	0.05	0.01	0.12	0.04	1.70E-03	4.70E-04	1.10E-01	6.50E-02	2.50E-02	1.20E-02	0.12	0.02	21	4	1.53	0.39	3	0.3	7.60E-02	2.50E-02
		Sep. 12	0.21	0.11	0.52	0.17	7.70E-02	4.60E-02	3.60E-01	2.10E-01	5.90E-02	3.00E-02	0.18	0.04	37	25	12.37	10.18	28.3	23.9	4.50E-01	9.10E-02
	Lt	Jun. 12	1.31	0.4	3.2	1.27	5.00E-01	1.70E-01	1.70E+00	3.90E-01	7.40E-01	2.80E-01	1.65	0.42	179	108	11.93	5.3	18.1	10.6	2.30E+00	4.60E-01
		Jul. 12	0.16	0.05	2.55	1.89	2.20E-02	1.80E-02	9.00E-01	5.80E-02	2.80E-01	1.40E-01	1.16	0.69	78	52	103.36	97.63	267.8	248.8	4.70E-01	9.50E-02
		Aug. 12	0.31	0.04	0.49	0.13	5.40E-02	3.80E-02	2.00E-01	4.10E-02	1.30E-02	6.30E-02	0.43	0.2	46	15	3.1	1.11	5.6	2.1	3.10E-01	8.70E-02
		Sep. 12	0.36	0.14	1.05	0.42	1.20E-01	6.70E-02	2.30E-01	9.00E-02	3.60E-01	1.70E-01	0.36	0.16	20	4	1.01	0.28	3.6	2.1	4.70E-01	1.70E-01
Triptères	Jun. 12	0.15	0.05	0.21	0.1	6.20E-02	1.20E-02	1.20E-01	4.00E-02	5.50E-02	2.40E-02	0.29	0.01	11	3	1.06	0.28	1	0.3	1.60E-01	4.70E-02	
	Jul. 12	0.13	0.03	0.52	0.05	3.50E-03	1.40E-03	1.40E-01	4.50E-02	8.30E-03	2.40E-03	0.39	0.14	48	9	3.88	1.46	12.8	3.8	2.70E-01	5.00E-02	
	Aug. 12	0.16	0.07	0.4	0.1	4.80E-02	3.10E-02	4.20E-01	1.20E-01	9.40E-02	4.30E-02	0.4	0.2	30	5	9.01	4.32	36.5	29	5.00E-01	2.50E-01	
	Sep. 12	0.55	0.22	0.64	0.34	2.60E-01	9.30E-02	5.10E-01	2.00E-01	5.60E-01	2.90E-01	1.35	0.27	15	8	2.02	0.85	1.8	0.6	5.70E-01	2.30E-01	
Lt	Jun. 12	0.1	0.03	0.8	0.28	3.70E-04	1.50E-04	1.40E-01	5.30E-02	1.10E-02	4.70E-03	0.14	0.06	58	15	6.65	3.54	17.4	10.2	2.30E-01	6.70E-02	
	Jul. 12	0.13	0.06	0.68	0.13	9.60E-02	9.00E-02	1.60E-01	8.90E-02	1.10E-01	9.10E-02	0.3	0.1	36	7	6.55	2.38	33.2	20.8	3.90E-01	1.30E-01	
	Aug. 12	0.04	0.01	0.34	0.14	2.10E-03	1.10E-03	3.70E-02	2.00E-02	1.00E-02	5.10E-03	0.08	0.03	15	4	1.3	0.46	7.6	4.3	2.10E-01	8.90E-02	
	Sep. 12	0.18	0.02	0.63	0.41	5.90E-04	1.80E-04	2.10E-01	5.90E-02	4.70E-02	3.60E-02	0.13	0.02	47	5	3.69	1.64	4.9	2.8	1.90E-01	3.50E-02	
Lt	Jun. 12	0.92	0.33	1.72	0.64	5.30E-01	3.00E-01	7.30E-01	1.50E-01	6.20E-01	1.70E-01	0.75	0.13	60	29	6.7	3.38	13.2	7.5	7.60E-01	2.10E-01	
	Jul. 12	0.15	0.06	0.87	0.61	2.90E-03	1.30E-03	2.60E-01	2.10E-01	4.50E-02	3.30E-02	0.13	0.07	40	18	22.11	19.13	51.9	40.8	2.90E-01	9.60E-02	
	Aug. 12	0.17	0.04	0.5	0.35	2.20E-03	6.50E-04	1.90E-01	8.40E-02	2.70E-02	5.50E-03	0.2	0.1	35	7	6.68	5.16	12.2	7.0	1.80E-01	7.20E-02	
	Sep. 12	0.32	0.12	0.54	0.18	1.00E-01	7.70E-02	2.20E-01	8.60E-02													

10. [MTs] de l'expérience en laboratoire « TBT »

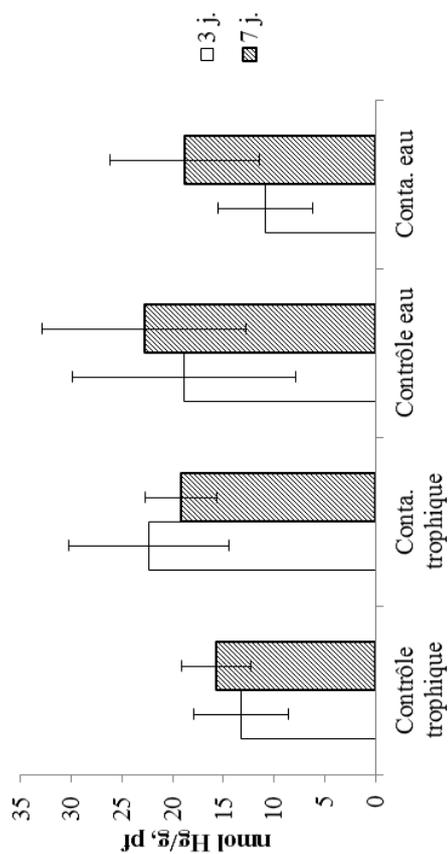
Métallothionéines dans la glande digestive



Métallothionéines dans les branchies

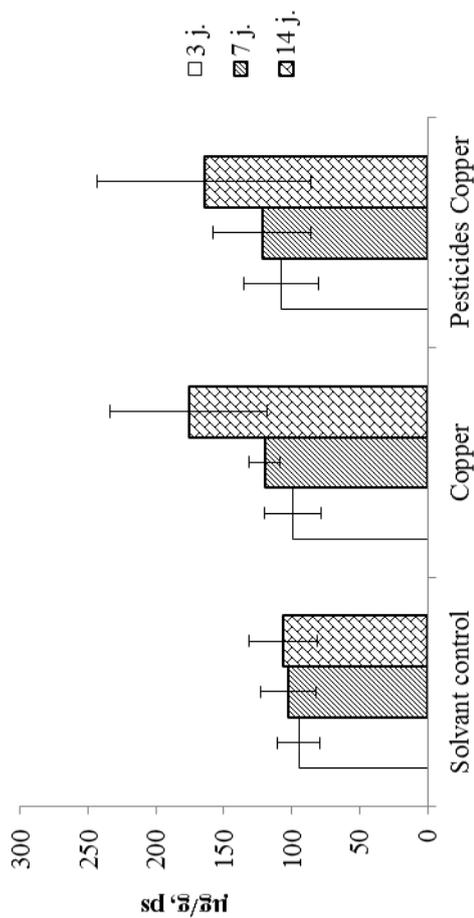


Métallothionéines dans les restes

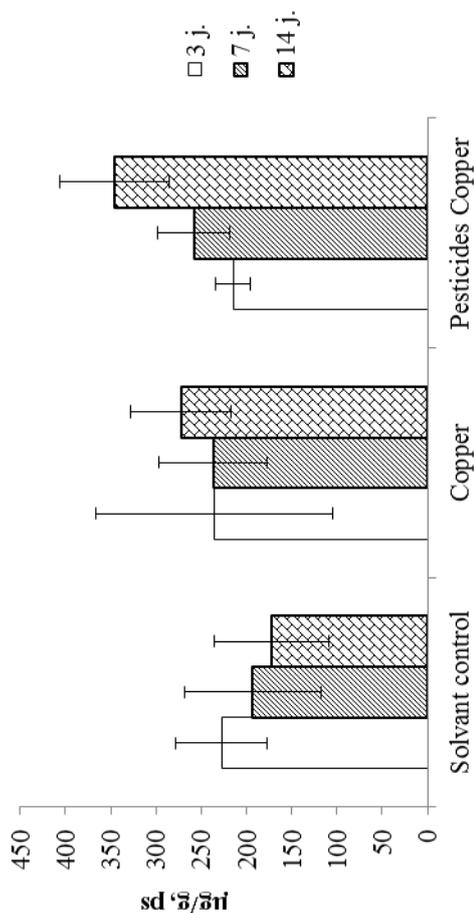


11. [Cu] et [MTs] de l'expérience en laboratoire « Pesticides – Cuivre »

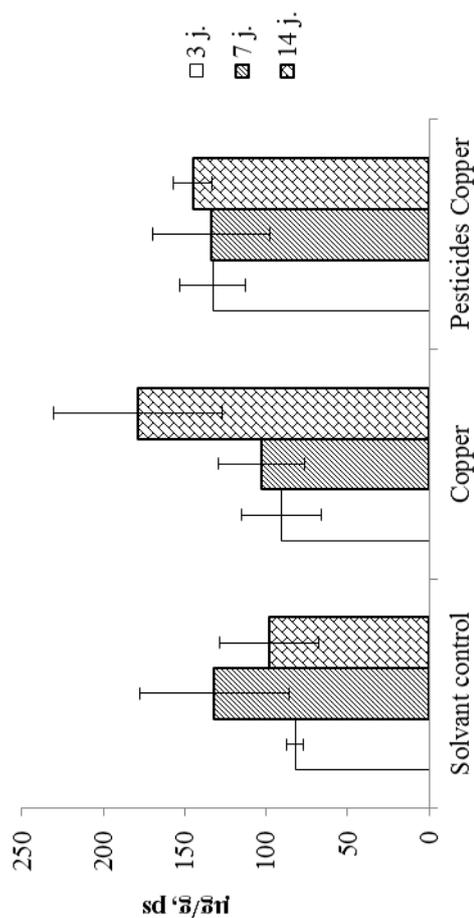
Cuivre dans la glande digestive



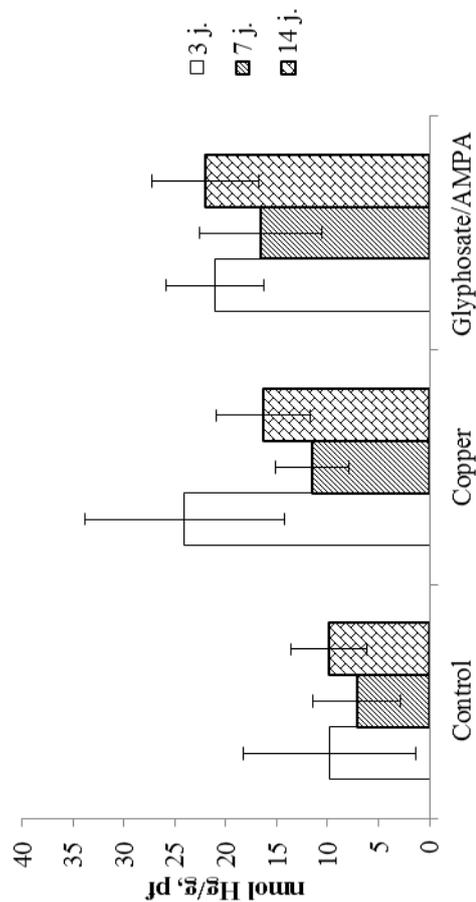
Cuivre dans les branchies



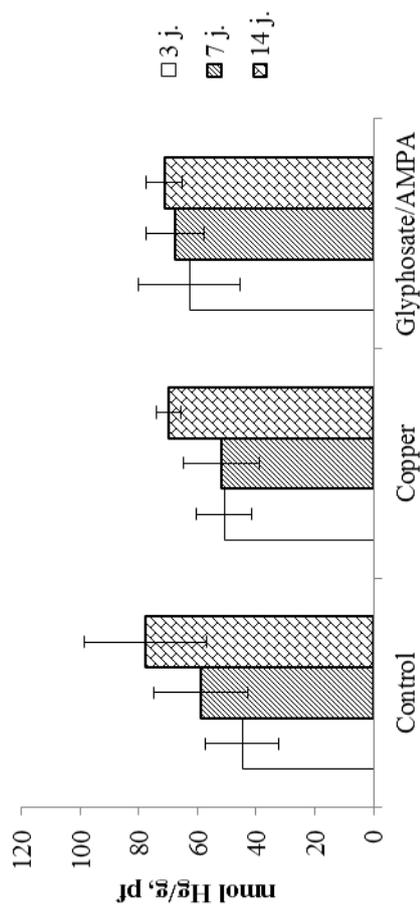
Cuivre dans les restes



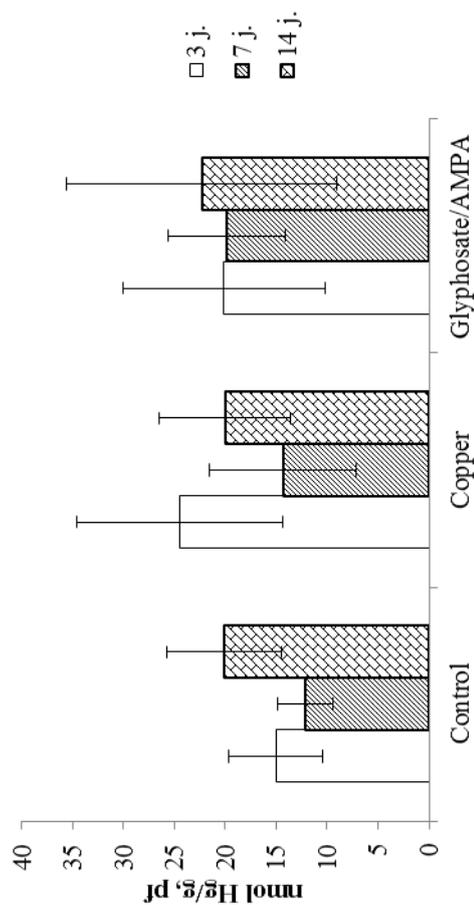
Métallothionéines dans les branchies



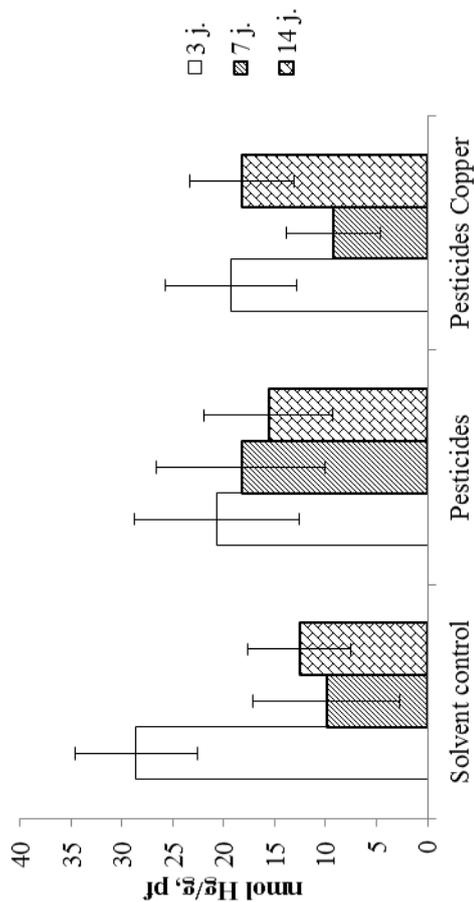
Métallothionéines dans la glande digestive



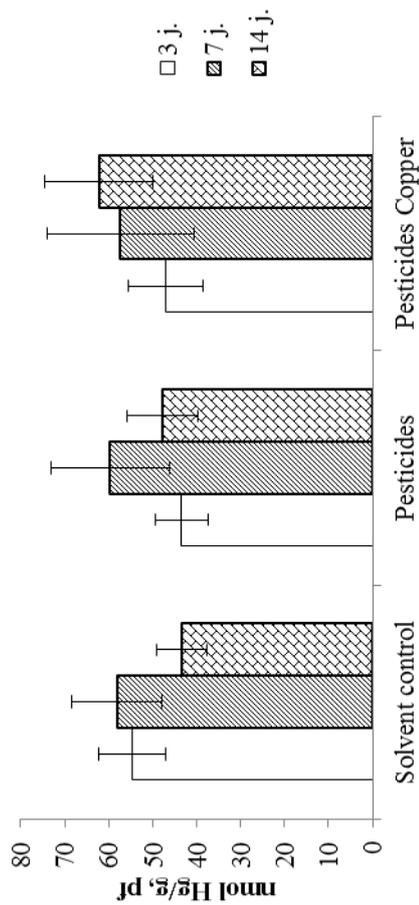
Métallothionéines dans les restes



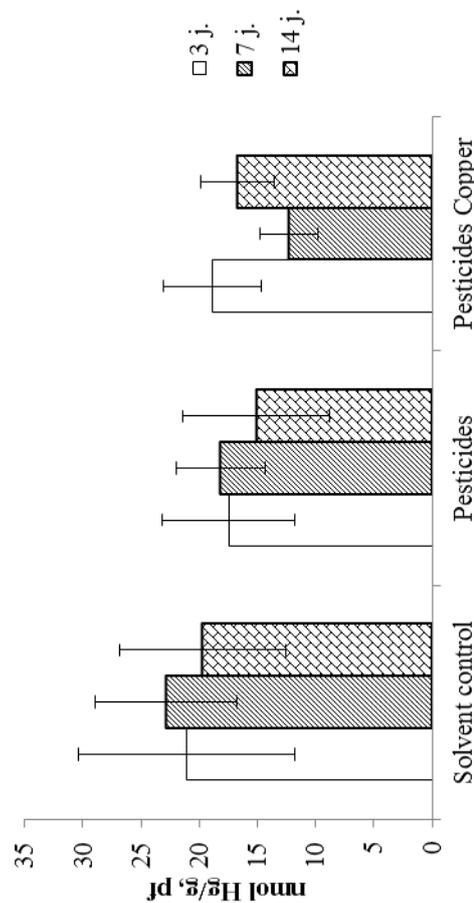
Métallothionéines dans les branchies



Métallothionéines dans la glande digestive



Métallothionéines dans les restes



12. Publication: Investigating the response of cuproproteins from oyster (*Crassostrea gigas*) after waterborne copper exposure by metallomic and proteomic approaches

Cite this: DOI: 10.1039/c0xx00000x

www.rsc.org/xxxxxx

ARTICLE TYPE

Investigating the response of cuproproteins from oyster (*Crassostrea gigas*) after waterborne copper exposure by metallomic and proteomic approaches

Ming Xu,^a Hugues Bijoux,^b Patrice Gonzalez,^b Sandra Mounicou^{*,†}¹ Received (in XXX, XXX) Xth XXXXXXXXX 20XX, Accepted Xth XXXXXXXXX 20XX

DOI: 10.1039/b000000x

The pacific oyster (*Crassostrea gigas*), a good model for studying biomineralization and coastal environment change, was used to study the cuproproteins expression after waterborne Cu exposure ($3 \mu\text{g Cu L}^{-1}$) similarly to Arcachon Bay aquatic environment. Cuproproteins in oyster cytosols were analyzed by gel electrophoresis (non-denaturing PAGE and SDS 2-DE) laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP MS) and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). The high molecular weight cuproproteins (identified as extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC Cu/Zn-SOD) and L-ascorbate oxidase) in oyster digestive gland were differentially expressed after Cu exposure. About 1.7 and 1.2-fold increase of Cu level in EC Cu/Zn-SOD and L-ascorbate oxidase were respectively determined, although EC Cu/Zn-SOD was 1.6–1.9-fold down-regulated in the oyster digestive gland after Cu exposure. At last, the role of EC Cu/Zn-SOD in protection against Cu exposure was discussed to propose possible mechanisms to better understand Cu homeostasis and/or detoxification mechanisms.

18 Introduction

The Arcachon Bay, located in the French Atlantic South-western Coast, gathers environmental and societal issues. Apart from the importance of this natural ecosystem for living organisms, it is also the 1st oyster farm and 2nd largest yachting harbor on the French Atlantic West Coast. Because of its attractiveness, the bay is subjected to anthropic pressure due to the yachting, urban growing, and indirect agricultural and industrial wastes. Therefore there is a particular interest to study, in the bay, the risk and impact of chemical pollutants (notably pesticides, PAH, metal and organotin compounds) towards waterborne exposed living organisms.¹ Although the bulk of urban and industrial wastes were banned to be dumped into the bay since 1971, boat-related activities have become predominant pollutants source, especially near the Arcachon harbour.^{2,3} Cu, one of the major contaminants in this bay because of its use in antifouling paint and pesticide in this surrounding area, can be encountered at concentration ranging between $3\text{--}10 \mu\text{g L}^{-1}$ in the seawater of Arcachon Bay.⁴

Cu, an essential metal for living organisms, becomes toxic

after exposure to high concentration in environment and/or through food. The toxic effects of Cu can be direct (*i.e.* binding to biological molecules and impairing their structure/function) and indirect (*i.e.* generating the reactive oxygen species (ROS) via the catalytic cycle of Haber-Weiss and Fenton reaction).⁵ To fight the Cu stress, various detoxification mechanisms have been involved utilizing cell components such as plasma membrane, organelles and biomolecules in cytoplasm. Among them, proteins are well known to have a central role to detoxify excess of $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ ions either by complexing these ions in cytosol or pumping them out of the cell. The cuproproteins (*i.e.* cuproenzymes) which use Cu as a cofactor are vital in the Cu homeostasis process, and their study can provide an insight into the response of organisms to Cu exposure.

The Cu concentration in oysters has been studied and could reach $2000 \mu\text{g g}^{-1}$ (dry weight, much higher than the ambient environment level) without any apparent signs of toxicity.⁶ This accumulation level can hardly be found in other marine species, and it is of concern to study Cu impact toward oyster to ensure their production and food safety. Oyster is recognized as a good model organism for biological and ecological research, and also as an important Cu-rich food for human being.⁵ As a filter-feeding invertebrate, its advantages include wide distribution, simplicity of sampling, sedentary nature, tolerance to a wide range of environmental conditions, and high potential for bioconcentration of environmental toxicants due to high filtration activity. It is therefore a good "sentinel" for monitoring pollutants (e.g. Cu) in coastal environment.⁷ So the fate and impact of Cu at the molecular level (*i.e.* biomolecule) in waterborne Cu-exposed

^a CNRS/UPPA, Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement, UMR5254, Hélioparc, 2 av. Pr. Angot, F-64033 Pau, France

^b EA, Université Bordeaux 1, UMR EPOC 5805, Place du Docteur Bertrand Paymeau, 33120 Arcachon

* Corresponding Author: E-mail: sandra.mounicou@univ-pau.fr; Fax: +33 559 407 674; Tel: +33 559 407 764

† Electronic Supplementary Information (ESI) is available

oysters requires to be elucidated to understand the Cu homeostasis or detoxification mechanisms of oyster.

The objective of this work was to determine proteins which would be involved in the complexation of internalized Cu in cytosol of two oyster organs. For that purpose, pacific oysters were exposed to a Cu level (ca. $3 \mu\text{g Cu L}^{-1}$) under controlled conditions to simulate the environmental aquatic Cu level ($3\text{--}10 \mu\text{g Cu L}^{-1}$)⁴ of Arcachon Bay. After exposure, the Cu distribution in oyster organs (*i.e.* gills and digestive gland) was firstly measured by ICP MS. Then the cuproproteins in cytosols were analyzed under non-denaturing conditions by SEC-ICP MS and ND-PAGE-LA-ICP MS, and identified by $\mu\text{RPC-ESI MS/MS}$. Finally, the regulation of cuproproteins was evaluated by SDS 2-DE.

Experimental

Reagents

All the gel electrophoresis reagents including 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Tris, > 99%), 30% acrylamide bis-acrylamide solution, sodium dodecyl sulfate (SDS, > 98%), ammonium persulfate (APS, > 98%), *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED, > 99%), urea (99.0–100.5%), dithiothreitol (DTT, > 99%), 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS, > 98%), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF, > 99%), iodacetamide, agarose and glycine (> 99%) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

The immobilized pH gradient (IPG) strips (18 cm, pH 3–10), IPG buffer (pH 3–10 NL) and immobiline DryStrip cover fluid were from GE Healthcare (Orsay, France). A Cu stock solution ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 4% HNO_3) was purchased from SCP science (Courtaboeuf, France). Water (18 M Ω cm) was obtained from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA). Unless stated otherwise, all other analytical reagent grade chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Instrumentation

Elemental analysis of ND-PAGE gels was achieved by coupling a UP213 (Nd:YAG source, wavelength: 213 nm) laser ablation system (Electro Scientific Industries, Fremont, CA) with an Agilent 7500cs ICP MS (Agilent, Tokyo, Japan). 500 mL min^{-1} of helium gas was used to transport ablated material toward the plasma of ICP MS through a T-connector. The ICP MS was equipped with a Micromist nebulizer mounted into a Scott spray chamber, and its parameters (torch (1.5 mm ID) position, carrier gas flow rate and ion lenses voltage) were tuned for each set of experiments using a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ solution of Y, Li, Tl and Ce. H_2 was used as reaction gas in the collision cell mode with a flow rate of 3.6 mL min^{-1} . The isotopes of ^{56}Fe , ^{65}Cu , ^{64}Zn , ^{55}Mn , ^{58}Ni and ^{59}Co were monitored.

For SEC-ICP MS, an Agilent 1200 HPLC system (Agilent, Wilmington, DE) was coupled to the Agilent 7500ce ICP MS. A superdex 75 10/300 GL column ($300 \times 10 \text{ mm ID}$, $13 \mu\text{m}$, GE Healthcare, Orsay, France) was used for sample analysis. The same isotopes were monitored as for LA-ICP MS.

$\mu\text{RPC-ESI-MS/MS}$ analysis was performed with an Agilent

1100 capillary HPLC system (Agilent, Tokyo, Japan) fitted with a Vydac C18 column ($150 \text{ mm} \times 1 \text{ mm ID}$, $5 \mu\text{m}$, Alltech/Grace, Templemars, France) and an electrospray LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany).

The experiments of ND-PAGE gel electrophoresis were carried out in a TV100 system (biostep GmbH, Meinersdorfer, Germany). For SDS 2-DE gel electrophoresis, an IEF-SYS system and a Maxi protein unit TV400 system (biostep GmbH, Meinersdorfer, Germany) were used. All of the gels were imaged with AGFA ARCUS II Scanner and the results were analyzed using 2D Platinum Software Version 5.0 (GE Healthcare, Orsay, France). For LA-ICP MS analysis, unstained gels were dried using a Hoefer GD 2000 slab gel dryer (Amersham Biosciences).

Experimental procedures

Animals and Cu exposure management. Glass experimental units (EU) of 120 L filled with artificial seawater (35 psu) were used during the experimentation. A permanent flowing system was set-up on the contaminated EU in order to stabilize the dissolved Cu concentrations. A clean water tank, a peristaltic pump and an overflow system were used to maintain stable volumes; 50% of the total volume was renewed every day.

Twenty-four months oysters originating from a clean Arcachon bay site (Arguin, a nature reserve since 1972) were purchased and acclimatized in an uncontaminated EU during 7 days. Temperature was set-up at $13 \text{ }^\circ\text{C}$ and an alternation of 12 h/12 h of dark and light was respected. No food was provided in order to prevent contamination from the trophic route. In the same time, contamination was set-up in the contaminated EU in order to reach chemical balance by saturating the potential adsorption sites of the tank. At the beginning of the exposure, 35 oysters were moved from the acclimation tank to the Cu contaminated EU. Five individuals were sampled before and after the 14 days of exposure and dissections were performed in order to separate gills and digestive glands from the rests of the soft bodies; samples were stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

The exposure was stabilized at the environmental level of $2.6 \pm 0.7 \mu\text{g Cu L}^{-1}$ (mean day $_{-14}$ \pm SD), using a peristaltic pump and a diluted CuCl_2 solution. This solution was daily prepared by diluting $625 \mu\text{L}$ of a stock solution ($1 \text{ g CuCl}_2 \text{ L}^{-1}$) in 500 mL of ultra-pure water, and delivered continuously. The stock solution of Cu was prepared prior to the exposure by diluting a standard vial of CuCl_2 (1000 mg CuCl_2 Titrisol, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) into 1 L of ultra-pure water in a Teflon bottle before storage at $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Metallothionein determination. The MTs concentrations were determined by cold inorganic mercury saturation assay⁸ followed by Hg quantification using atomic absorption spectrometry (LECO AMA 254, ALTEC, Prague, Czech Republic). This method is based on the maximal affinity of mercury for the thiol groups of the MTs clusters. Quantifying mercury after proteins saturation allows us to indirectly measure the MTs levels, expressed in nmol of Hg binding sites per gram of fresh weight (fw).

Protein extraction and Cu determination. For each experiment, 5 samples per organ (three biological replicates) were

176 pooled to average individual variability. The oyster organs were
177 homogenized and extracted with an extraction buffer solution (50
178 mM Tris, 250 mM Sucrose, 1 mM PMSF, pH 7.4) with liquid
179 nitrogen grinding. The buffer solution was kept ice cold before
180 use. 1 g of tissue sample was homogenized with 1.9 mL of buffer
181 and the homogenate was left for 1 h at 4 °C for protein extraction.
182 Then the homogenate was centrifuged at 12,000 rpm for 30 min
183 at 4 °C. The supernatant obtained was centrifuged another 30 min
184 at the same speed, the second supernatant was filtered (0.2 µm
185 Nylon Membrane Centrifugal Filters, VWR International, LLC,
186 USA) to obtain the cytosols. The protein concentrations of the
187 cytosols were quantified using a BCA Protein Assay Kit (Sigma-
188 Aldrich) by external standard calibration method. The UV
189 absorbance (545 nm) of the protein solutions was measured by a
190 STAT FAX 303 Plus Microstrip Reader (Block Scientific Inc.,
191 Bohemia, USA). The remaining cytosols were stored at -80°C for
192 further analysis.

193 Meanwhile, one aliquot of 50 µL of cytosol was used for total
194 Cu determination. Another 50 µL aliquot of the cytosol was
195 partitioned in two fractions (MW > 2 kDa and < 2 kDa) using
196 cut-off filters (2000 MW cut-off, Vivacon 500, Sartorius Stedim
197 Biotech GmbH) by centrifugation (10,000 rpm, 10 min × 3, 4
198 °C). Then 50 µL cytosolic and cut-off fractions aliquots were
199 directly diluted with 2% HNO₃ (69.0-70.0%, J. T. Baker) to 2 mL
200 and analyzed with ICP MS. Total Cu amount in samples was
201 determined by ICP MS (Agilent 7500ce) using external
202 calibration method with Cu concentrations ranging from 2.5 to
203 250 ng mL⁻¹.

204 **SEC-ICP MS analysis.** The SEC column was calibrated with
205 protein standards (ferritin (450 kDa), bovine serum albumin (66
206 kDa), superoxide dismutase [Cu-Zn] (33 kDa), metallothionein (6
207 ~ 7 kDa) and glutathione (307 Da)). Cytosols were fractionated
208 by continuous elution at 0.7 mL min⁻¹ of 100 mM CH₃COONH₄,
209 pH 7.4. For each sample, a volume of 100 µL was injected.
210 Between each run, the SEC column was cleaned by injecting 5 ×
211 100 µL EDTA (50 mM) solution to maintain ⁶⁵Cu and ⁶⁴Zn
212 background lower than 10³ and 10⁴ counts respectively.

213 **ND-PAGE and LA-ICP MS imaging.** The ND-PAGE
214 protocol employed was based on the modification of typical SDS-
215 PAGE gel electrophoresis protocol.⁹ Detergent reagents such as
216 DTT and SDS were removed to set non-denaturing gel
217 electrophoresis condition. All equipments were cleaned with
218 Milli-Q H₂O to remove residual SDS reagent before experiments.
219 Then, 8 × 8 cm², polyacrylamide gels (4%, 8% or 12%
220 acrylamide/bis-acrylamide, 375 mM Tris (pH 8.8), 0.01% APS
221 and 0.001% TEMED) were prepared. 100 µg of standard proteins
222 (i.e. bovine serum albumin (BSA, fraction V, > 96%), transferrin
223 (Tf, human, > 98%) and carbonic anhydrase (CA, bovine
224 erythrocytes, 91%)) and/or 100 µg cytosolic protein (protein
225 concentration of cytosols: ca. 2 mg mL⁻¹) were directly loaded
226 into the slots of gels, and a program (80 V for 0.5 h and 100 V for
227 3.5 h) was carried out in the Tris-glycine buffer (25 mM Tris, 192
228 mM glycine, pH 8.3). Gels were run in duplicate, one for protein
229 bands visualizing by means of 0.1% coomassie brilliant blue
230 (CBB) staining and the other unstained-one for LA-ICP MS
231 imaging analysis after drying at 80 °C for 1h by Hoefer GD 2000
232 slab gel dryer on the 3MM Chromatography Paper (Whatman,

VWR, Pessac, France). After drying process, the gels were
233 covered by Saran film (Dow Chemical Company) to avoid
234 potential contamination until LA-ICP MS analysis.

235 For elemental imaging by LA-ICP MS, the gel was cut into
236 uniform pieces (3.8 × 0.7 cm²), and each gel piece was scanned
237 line by line with a distance of 500 µm between each of them. The
238 ablation was performed in a focused spot mode with 20 Hz
239 repetition rate and 100% energy delivered. The laser beam spot
240 size and scan speed were set to 250 µm and 100 µm s⁻¹,
241 respectively. Finally, the collected data were processed with
242 Matlab 7 software (MathWorks, Meudon, France) for Cu imaging,
243 and the individual images were regrouped to obtain the full size
244 image using Adobe Photoshop CS5 software (Adobe Systems Co.,
245 Ltd.).

246 **SDS 2-DE.** Cytosolic proteins were precipitated with ice-cold
247 10% trichloroacetic acid in acetone and wash with 100% ice-cold
248 acetone. The protein pellet was air dried and stored at -20 °C. For
249 SDS 2-DE experiment, 5 mg of each protein pellet was dissolved
250 in 1 mL re-hydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4%
251 CHAPS, 65 mM DTT, 0.1% IPG buffer, 0.01% bromophenol
252 blue). Then 300 µL protein solutions were respectively loaded
253 onto 18 cm, pH 3-10 IPG strips and left for re-hydration
254 overnight. Three independent experiments were performed as
255 biological replicates. Isoelectric focusing (IEF) was performed at
256 250 V for 0.5 h, 1000 V for 0.5 h, a gradient up to 6000 V for 4h,
257 and finally 6000 V until 40 kVh. After IEF, the strips were
258 equilibrated for 15 min in 0.375 M Tris, 6 M urea, 20% glycerol,
259 2% SDS, 2% DTT, pH 8.8, and subsequently for 15 min in the
260 same buffer solution where DTT was substituted with 2.5%
261 iodoacetamide. The equilibrated strips were transferred to the top
262 of 12% polyacrylamide gels (12% acrylamide/bis-acrylamide,
263 375 mM Tris (pH 8.8), 0.01% SDS, 0.01% APS and 0.001%
264 TEMED, 20 cm × 20 cm) for the second dimension. The SDS-
265 PAGE program was carried out at 100 V for 0.5 h and 180 V for
266 4 h. The gels were stained with 0.1% coomassie brilliant blue
267 R250 solution. ColorBurst Electrophoresis Marker (220 ~ 8 kDa,
268 Sigma-Aldrich) was used.

269 All of the gels were imaged with AGFA ARCUS II Scanner
270 and the results were analyzed using 2D Platinum Software
271 Version 5.0 (GE Healthcare, Orsay, France). Image analysis
272 included spot detection, spot quantification, background
273 subtraction, and spot matching. Only the spots present in all the
274 biological replicates were considered for subsequent analysis.
275 Protein spots which have distinct shape and significant change
276 (fold change > 1.5) for three biological replicates (*p* < 0.05,
277 Student's *t*-test with Origin 7.0 software) between control and
278 Cu-exposed groups were chosen for further identification by MS,
279 and the quantitative analysis of their fold changes were calculated
280 based on their spot density (*I*) in the 2D gels.

281 **Protein identification by µRPC-ESI-MS/MS.** For ND-PAGE
282 and SDS 2-DE, Cu-containing protein bands and spots were
283 manually excised from the gels. The excised pieces were washed
284 with 500 µL of H₂O for 10 min, and then three times with 50 mM
285 NH₄HCO₃, 50% acetonitrile (ACN) until the blue color
286 disappeared. After washing with 100% ACN and air drying, 1 µL
287 of 50 ng µL⁻¹ trypsin (proteomics grade) solution was added for

overnight digestion at 37 °C. Finally, 8 μL of peptide mixtures were analyzed by $\mu\text{RPC-ESI-MS/MS}$. The flow rate was at 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ of 0.05% formic acid in H_2O (solvent A) and ACN (solvent B). The gradient program lasted for 3 min at 2% B and then increased to 50% linearly in 35 min. Between each run, the column was equilibrated at least 10 min at 2% B. The MS was operated in the positive ion mode and the m/z 350 to 2000 range was scanned with a resolution set at 100,000 ($m/\Delta m$, fwhm (full width at half maximum) at m/z 400). The spray voltage and capillary temperature were respectively set at 3.3 kV and 300 °C. The 10 most intense ions of each full scan were selected to be fragmented using collision induced dissociation (CID) at normalized collision energy of 35%. The raw data were analyzed using Xcalibur 2.1 software (Thermo Fisher Scientific).

For protein identification, raw data files were converted to Mascot generic format (mgf) files and searched in National Center for Biotechnology Information (NCBI) database via Mascot Search (version 2.4, Matrix Science) with the taxonomy as Other Metazoa. Mascot search parameters included trypsin as the proteolytic enzyme with 1 missed cleavage. The peptide and MS/MS tolerances were set at 10 ppm and 0.1 Da, respectively. The modifications of carbamidomethyl and methionine oxidation were selected. Peptide charge was set to +1, +2 and +3. A minimal Mascot score of 25 and two different identified peptides were set for protein identity validation. The bioinformatics analysis was done according to the Gene Ontology (GO) annotations of identified proteins from UniProt database (Universal Protein Resource, www.uniprot.org, UniProt release 2013_03).

Results and discussion

Cytosolic Cu concentrations in oyster organs. Gills and digestive gland of *C. gigas* were selected as the target organs to study the expression of cuproproteins after waterborne Cu exposure. Gills are the first barrier against waterborne pollution with transfer of nutrients and pollutants toward other organs like digestive gland which is the site for digestive enzyme production and digestion process. These two organs have been shown to be involved in metal accumulation¹⁰ with different behaviours in oyster under low and high Cu-exposure conditions (3.2 and 32 $\mu\text{g Cu L}^{-1}$).¹¹

The concentrations of six metals (Cu, Mn, Fe, Co, Ni and Zn) in cytosols of oyster organs were measured and compared. The

exposure. To be emphasized that here only the cytosolic Cu (*i.e.* Cu bound to biomolecules) is studied which correspond to ca. 25–40% of total Cu in the organ according to subcellular fractionation methods,^{12,13} while insoluble Cu components (*i.e.* Cu associated to cell debris including membranes, metal-rich granules and organelles) is about 60–75%. The highest Cu concentration (14.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ wet wt.) found in digestive gland

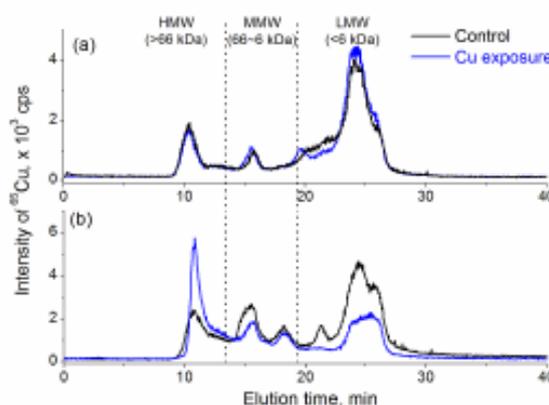


Fig. 1 Cu distribution patterns among HMW, MMW and LMW biomolecules in cytosols of oyster gills (a) and digestive gland (b) for control and Cu-exposure groups analyzed by SEC-ICP MS.

indicated that it is a greater Cu-accumulating organ than gills after exposure at environmental Cu concentrations level (ca. 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ in this work; ca. 3–10 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the seawater of Arcachon Bay⁵), in agreement with a previous study (3.2 $\mu\text{g L}^{-1}$).¹¹

Except Zn, the concentrations of other metals (*i.e.* Mn, Fe, Co and Ni) decreased (10 ~ 80%) after Cu exposure. Probably, Cu disturbed the metabolic pathway of these metals and/or replaced them to form complexes with biological molecules due to the higher chemical affinity of Cu to chemical ligands based on Irving-Williams series ($\text{Zn}^{2+} < \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$). Zn homeostasis exhibits opposite trends in the gills (18% decrease) and digestive gland (19% increase) after Cu exposure.

Cu distribution pattern among cytosolic biomolecules. The Cu species distribution in cytosols of oyster gills and digestive gland were first analyzed and compared for control and Cu-exposed groups by SEC-ICP MS in Fig. 1. The chromatographic results show different ⁶⁵Cu peak profiles for these two organs, and notable changes have only been observed for digestive gland. For

Table 1. Metal concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ wet weight, n=3) in cytosols of oyster gills and digestive gland for control and Cu-exposure groups.

Organs	Metals					
	Cu	Mn	Fe	Co	Ni	Zn
Gills	6.6 ± 0.4 ^a	0.46 ± 0.02 ^a	1.6 ± 0.2 ^a	0.05 ± 0.02 ^a	0.18 ± 0.01 ^a	89.7 ± 4.6 ^a
	10.3 ± 0.2 ^b	0.36 ± 0.01 ^b	1.3 ± 0.1 ^b	0.02 ± 0.01 ^b	0.13 ± 0.02 ^b	73.9 ± 0.8 ^b
Digestive gland	11.5 ± 0.1 ^a	0.79 ± 0.05 ^a	3.5 ± 0.7 ^a	0.13 ± 0.04 ^a	0.24 ± 0.05 ^a	82.8 ± 1.3 ^a
	14.8 ± 0.3 ^b	0.43 ± 0.01 ^b	2.3 ± 0.3 ^b	0.03 ± 0.01 ^b	0.11 ± 0.01 ^b	98.3 ± 1.5 ^b
Rest of the body	8.9 ± 0.1 ^a	2.2 ± 0.1 ^a	2.3 ± 0.5 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.02 ^a	129.5 ± 2.3 ^a
	11.7 ± 0.2 ^b	1.4 ± 0.3 ^b	1.8 ± 0.1 ^b	0.02 ± 0.01 ^b	0.09 ± 0.01 ^b	126.3 ± 2.1 ^b

^a control group; ^b Cu-exposure group.

results in Table 1 indicate that Cu content increased 1.3 ~ 1.6 fold in the cytosols of all oyster organs after waterborne Cu

both gills and digestive gland, three Cu fractions were defined according to the molecular weight, *i.e.*, high molecular weight

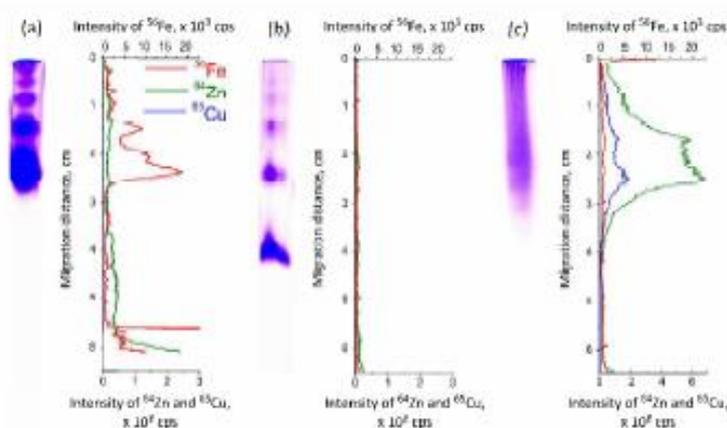


Fig. 2 ND-PAGE-LA-ICP MS electropherograms of (a) Tf, (b) BSA and (c) CA in 8% polyacrylamide gels with their corresponding stained gel at their left side; for each experiment, 100 μ g of protein was loaded.

360 (HMW, > 66 kDa) proteins, medium molecular weight (MMW, 66 ~ 6 kDa) proteins and low molecular weight biomolecules
362 (LMW, e.g. peptides and organic/inorganic compounds, < 6 kDa).
For gills, Cu distribution is nearly unchanged regardless exposure
364 conditions. Indeed, taking into account fraction areas, Cu is found
associated mainly (73 ~ 75%) with LMW biomolecules and the
366 remaining Cu in cytosol is fairly equally distributed between the
HMW (13 ~ 15%) and MMW (ca. 12%) fractions. To note that
368 the identical chromatographic response and pattern of Cu in gill
cytosols does not reflect the variation of Cu concentrations (Table
370 1) between the control and Cu-exposure conditions. This
disagreement can be explained by the low recovery (ca. 24%) of
372 weakly bound Cu to biomolecules and Cu^{2+/+} in these cytosolic
samples from the size exclusion column. This was supported by
374 the significant proportion (52%) of Cu associated to biomolecules
lower than 2 kDa determined by quantitative Cu analysis after
376 partitioning of the raw cytosol by means of cut-off filtration. In
digestive gland, while the proportion of Cu associated with
378 MMW proteins is similar for both control and Cu-exposure
conditions (27 and 29% respectively), Cu exposure leads to a 2-
380 fold increase (16 to 33%) of Cu in the HMW fraction and a 1.5-

fold decrease (57 to 38%) in the LMW fraction. This could point
382 out that LMW protein involved in detoxification pathway (e.g.
metallothionein-like protein) were saturated and the excess Cu
384 would be up-taken preferentially by HMW proteins. This
phenomenon has been introduced in the literature as the
386 "spillover" model.¹⁴ These results demonstrate the role of HMW
proteins (e.g. superoxide dismutase) in scavenging *in vivo* Cu
388 excess in oyster digestive gland for detoxification purpose.
Within the MMW fraction, it is interesting to note a Cu peak apex
390 corresponding to the MW of 33 kDa matching the elution of
Cu Zn-SOD monomer marker. Furthermore, toward the limit of
392 LMW fraction (6 ~ 7 kDa), the second Cu peak apex may let us
suppose the presence of metallothionein (6 ~ 15 kDa for *C. gigas*,
394 e.g. UniProt: F6M9X3, Q9NG19 and K1QI42) which would be
involved in Cu detoxification. Additionally, metallothioneins
396 quantification by the cold inorganic mercury saturation assay⁸
method revealed a significant difference (non-parametric test of
398 Mann-Whitney ($p < 0.05$) between control (53 = 6 nmol Hg/g,
fresh weight) and exposed (70 = 4 nmol Hg/g, fresh weight)
400 groups, supporting the hypothesis of bio-induction of MTs after
Cu-exposure. Nevertheless more experiments would be needed to

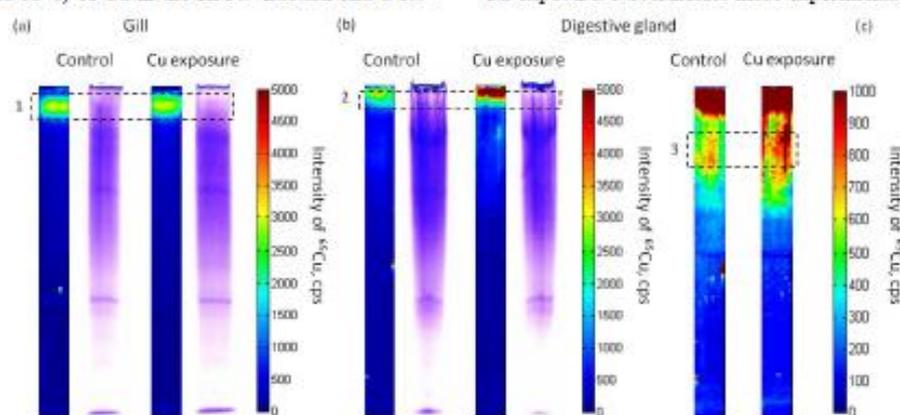


Fig. 3 Coomassie Blue-stained gels and ⁶⁵Cu ND-PAGE-LA-ICP MS images of gills (a) and digestive gland (b) cytosols of control and Cu-exposed oysters and (c) is a intensity scale magnification of the results presented in (b); protein bands 1, 2 and 3 in square dashed line were in-gel tryptically digested and analyzed by μ RPC-ESI-MS/MS for protein identification.

confirm the complexation of Cu by MTs. Finally, the elution at the total volume of the column of Cu-bound to LMW biomolecules prevents any conclusion in terms of the species identity.

Elemental imaging of ND-PAGE by LA-ICP MS. Compared with typical SDS-based denaturing electrophoresis, non-denaturing conditions are a prerequisite to maintain the integrity of metalloproteins (Cu-containing proteins and others) as it has been already reported.¹⁵⁻¹⁸

To initiate experiments, non-denaturing conditions were investigated with commercially available proteins (*i.e.* Tf, BSA and CA) among which two were metalloproteins. The gel staining first revealed the presence of isoforms or polymers (eventually some impurities) in these proteins standards (Fig. 2) and confirmed that protein migrated according to their own intrinsic charge and molecular weight. As expected, no signal was detected for BSA in elemental electropherogram (Fig. 2b) while Tf and CA were successfully detected through their metal cofactors (*i.e.* Fe and Zn). For Tf (Fig. 2a), three main ⁵⁶Fe peak apexes (at 2.4, 2.1 and 1.5 cm) are detectable at migration distance where two stained protein bands are visible, demonstrating that the lack of resolving power of non-denaturing electrophoresis can be compensated by the elemental detection. Besides that, the strong Fe signal detected at 5.6 cm, which corresponds to the electrophoretic front, might be caused by the loss of Fe³⁺ ions from Tf. Other minor Fe peaks could also be detected (at 1.0, 0.7 and 0.3 cm) where some protein bands were visible. Elemental electropherograms of CA (Fig. 2c) exhibited similar pattern for Zn and Cu, with a 4-times higher signal for Zn.

three polyacrylamide gels (4%, 8% and 12%) were compared directly for the oyster cytosols. According to the CBB-stained gels (Fig. S1), a better resolution and more focused/less diffused protein bands were obtained with the 8% polyacrylamide gel. Consequently, the gills and digestive gland cytosols of control and Cu-exposed oysters were separated under this condition (8% polyacrylamide gel) and imaged by LA-ICP MS. On one hand, Cu images of gills cytosols have shown only one band (protein band 1) at the top of gels with the same Cu intensity for control and Cu-exposed groups (Fig. 3a). It has to be underlined that this stability in terms of signal intensity is consistent with the SEC-ICP MS data. On the other hand, Cu images of digestive gland (Fig. 3b) pointed out a single band (protein band 2) with increasing Cu intensity (ca. 1.7-fold) after Cu exposure. By applying a magnification on the intensity scale of the Cu images of the digestive gland (Fig. 3c), another Cu band (protein band 3) could be observed (1.2-fold more intense for Cu-exposed group than control group), although its signal intensity was nearly one order lower than protein band 2.

Identification of potential cuproprotein targets complexing excess Cu ions by μ RPC-ESI-MS/MS. A proteomic approach was used to identify cuproproteins in protein band 1, 2 and 3 of gills and digestive gland cytosols of control and Cu-exposed oysters. A total of 7, 12 and 25 reliable proteins (identified peptides > 2, Mascot score > 25) belonging to *C. gigas* were respectively identified in protein band 1, 2 and 3 (Table S1). Among these proteins, 3, 2 and 8 metalloproteins were confirmed to hold metal cofactors according to UniProt database (www.uniprot.org) in Table 2, with 2 cuproproteins included (*i.e.*

Table 2. Metalloproteins identified in cytosols of oyster gills (band 1 in Fig. 3) and digestive gland (band 2 and 3 in Fig. 3) for both control and Cu-exposed groups by ND-PAGE and μ RPC-ESI-MS/MS.

Protein band	Accession no. ^a	Mascot score	Sequence coverage	Identified peptides	Protein ^b	Metal cofactor ^c
1	gi405960663	27	20%	2	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	Cu, Zn
	gi405970056	104	15%	2	Kyphoscoliosis peptidase	Zn
	gi40643026	42	14%	2	Ferritin	Fe
2	gi405960663	117	13	2	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	Cu, Zn
	gi405970056	65	15	2	Kyphoscoliosis peptidase	Zn
	gi405968187	64	4	3	L-ascorbate oxidase	Cu
3	gi405970056	137	10	2	Kyphoscoliosis peptidase	Zn
	gi405966217	225	9	3	Prostaglandin reductase 1	Zn
	gi405966618	60	6	2	Carbonic anhydrase 2	Zn
	gi405959834	98	17	3	Catalase	Fe
	gi405956520	167	15	8	Putative aminopeptidase	Mn
	gi405970867	192	4	3	Enolase	Mg
	gi405978716	177	8	6	Alpha-actinin	Ca

^a NCBI nr database accession number; ^b Taxonomy is restricted to *Crassostrea gigas*; ^c UniProt database.

This might be due to the replacement of Zn by Cu in this Zn-containing enzyme as already reported.¹⁷ Given the fact that the metalloprotein could be preserved, at least partially, using this protocol even so its resolving power was lower than SDS-PAGE, this method was applied for Cu-containing proteins analysis in oyster cytosols.

To improve the resolving power of this ND-PAGE protocol,

EC Cu/Zn-SOD and L-ascorbate oxidase). The chemical and biological properties of these two cuproproteins are listed in Table 3. Their high MWs (> 100 kDa) in native state are consistent with SEC-ICP MS and ND-PAGE-LA-ICP MS data. Additionally, the coexistence of Zn and Cu in protein band 2 with similar intensity (Fig. S2) also supports the presence of EC Cu/Zn-SOD. To note that the database search indicated the presence of cavortin by identification of two peptides. Cavortin

Table 3. Chemical and biological properties of cuproproteins identified.

Cuproprotein	Metal cofactor ^a	MW ^a / subunit number	Biological process ^b	Molecular function ^b	Ref
Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	4 Cu / 4 Zn	130 kDa / 4	superoxide metabolic process oxidation-reduction process	metal ion binding superoxide dismutase activity	18,19
L-ascorbate oxidase	8-10 Cu	140 kDa / 2	L-ascorbic acid oxidation oxidation-reduction process	Cu ion binding oxidoreductase activity	27

^a native molecule composed of subunits; ^b UniProt database.

differs from EC Cu/Zn-SOD by only nine different residues while sharing three identical peptides. However as no specific peptide of cavortin wasn't detected, its presence couldn't be fully guaranteed. Therefore cavortin was removed from the list of potential Cu targets. The EC Cu/Zn-SOD is one of the best-known cuproprotein/cuproenzyme in organisms,^{5,19,20} because of its role for scavenging overproduction of ROS (*i.e.* O₂⁻) and maintaining the oxidation-reduction balance by catalyzing the dismutation of O₂⁻ into O₂ and H₂O₂.²¹ It is found in the extracellular matrix and on cell surfaces of tissues, and can prevent the cell and tissue damage from extracellular ROS. Tissue EC-SOD is thought to account for 90 ~ 99% of the EC-SOD in the body of mammalian species.²² It is unique in requiring two essential metals (*i.e.* Cu and Zn) for catalytic function. The enzymatic activity and expression of SOD have been recognized as good indexes for Cu status in marine organisms.²³⁻²⁵ Besides EC Cu/Zn-SOD, L-ascorbate oxidase which belongs to multi-copper oxidase family,²⁶ is also an important candidate whose expression and activity was found to markedly increased in a plant species (*Cucurbita spp.*) after Cu exposure.^{27,28} However, the Cu detoxification mechanism involving L-ascorbate oxidase was still unclear. Recently, a genomic approach demonstrated the importance of EC Cu/Zn-SOD and multi-copper oxidases (e.g. L-ascorbate oxidase) in defense mechanisms of *C. gigas* against environmental stress (e.g. Cu).²⁹ To summarize, our results illustrate that EC Cu/Zn-SOD and L-ascorbate oxidase are the potential protein targets to complex *in vivo* Cu excess. Additionally, it should be emphasized that other metalloproteins identified in Table 2 might also complex Cu through the replacement of their own metal cofactors just as Cu found in carbonic anhydrase standard (Fig. 2c). Even if the presence of Cu-protein complex couldn't be evidenced by molecular mass spectrometry through the detection of Cu-binding peptides, this work provides first part of the answer concerning biomolecules playing a role in Cu homeostasis mechanism. Further analytical developments involving higher separation efficiency techniques (e.g. non-denaturing 2D-HPLC or 2D-PAGE) combined with high resolution mass spectrometry (ESI FT MS) would be required to support our findings and to refine the list of potential Cu protein targets.

Expression of EC Cu/Zn-SOD in digestive gland of *C. gigas* after waterborne Cu exposure. A proteomic method based on SDS 2-DE and μ RPC-ESI MS/MS, was used to study the differential protein expression in digestive gland cytosols of control and Cu-exposed oysters. Fig. 4 represents the typical protein pattern of digestive gland cytosols in 2D gels for both control and Cu-exposed groups. In each gel, about 300 distinct protein spots could be detected and were of relatively high

abundance taking into account the coomassie blue staining method used. Some spots show significant changes (> 1.5-fold), indicating that protein expression was affected by waterborne Cu exposure. Among differentially expressed proteins, EC Cu/Zn-SOD was identified (sequence coverage of 47%) in protein spots (spot 1, 2 and 3) marked with arrows. To note that due to the presence of too many protein spots in the 2D gel, the absence of information about its isoelectric point and its relatively low abundance, the search of L-ascorbate oxidase in the gel failed. A series of posttranslational modification SOD forms (≥ 3) could be observed in the range of pI 4.5 ~ 6.0 (reported pI 4.6).¹⁹ Their measured molecular weight is ca. 30 kDa which is higher (due to the posttranslational modifications such as glycosylation) than the theoretical values of EC Cu/Zn-SOD monomer (21 kDa, NCBI database: gi405960663) but agreed with the reported value (*i.e.* 32 kDa).^{19,20} Compared with the control group, 1.6-1.9-fold down-regulation of EC Cu/Zn-SOD happened in Cu-exposed group. This down-regulation phenomenon can be explained by the *in vivo* excess ROS (e.g. OH[•] radicals) produced by Cu, which can induce the DNA/RNA damage and protein oxidation/aggregation. This differential expression suggests that the *in vivo* balance in pro-oxidant/antioxidant homeostasis was disrupted by Cu excess as Cu/Zn-SOD is one of the most important ROS scavengers.⁵ Cu/Zn-SOD has a central role on oxygen regulation. Abnormal Cu increase will enhance ROS generation through Haber-Weiss and Fenton reaction. The down-regulation of Cu/Zn-SOD will further promote the generation of ROS radicals. On the other side, our results have indicated that EC Cu/Zn-SOD could complex more Cu even their amounts decreased based on the results of ND-PAGE-LA-ICP MS and SDS 2-DE. One possible mechanism is that Cu may compete and replace Zn ion incorrectly into the Zn site of SOD by forming Cu/Cu-SOD.³⁰ Additionally, a surface-exposed cysteine residue in SOD may also coordinate Cu.³¹ However, we cannot figure out the actual happening biochemical reaction in this study, but our data brought an insight into the understanding of Cu homeostasis in oysters after waterborne Cu exposure.

Conclusions

Cuproproteins in response to waterborne Cu exposure have been investigated in *C. gigas* by metalloomic and proteomic approaches. EC Cu/Zn-SOD and L-ascorbate oxidase were found directly involved in Cu homeostasis and/or detoxification. The possible role of EC Cu/Zn-SOD in protection against Cu exposure was discussed although some underlying mechanisms remain unclear. More detailed studies are necessary to answer these questions and will promote the understanding of Cu cytotoxicity in living organisms.

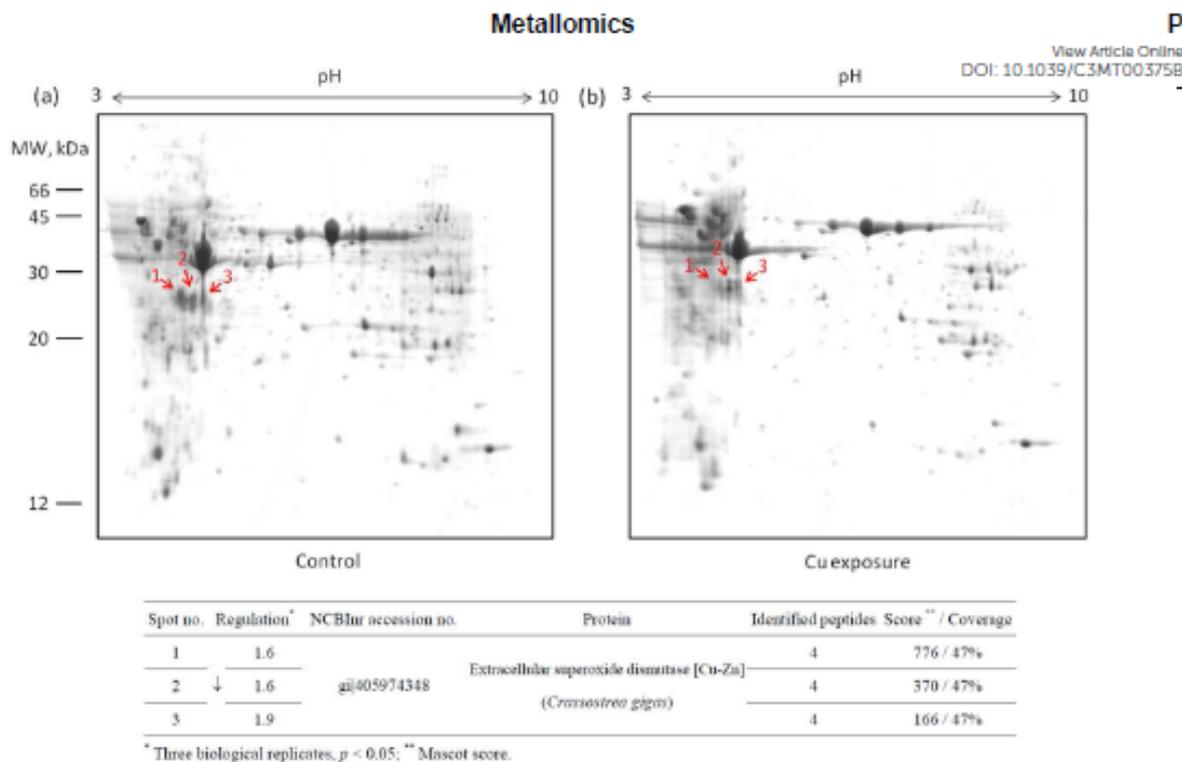


Fig. 4 SDS 2-DE maps of water-soluble proteomes in (a) control and (b) Cu-exposed digestive glands of *Crassostrea gigas*; the protein spots (1, 2 and 3) marked with arrows were identified as EC Cu/Zn-SOD by μ RPC-ESI-MS/MS and their detailed information are listed in the table.

Acknowledgements

Financial support from ANR (Agence Nationale de la Recherche) through project RIPOST 09-CESA-005 (Interdisciplinary research on the oysters' problem in the Arcachon Bay; in situ and experimental approaches) is acknowledged. The contribution of the Region of Aquitaine and the FEDER funds via CPER A2E (31486/08011464) project is acknowledged.

References

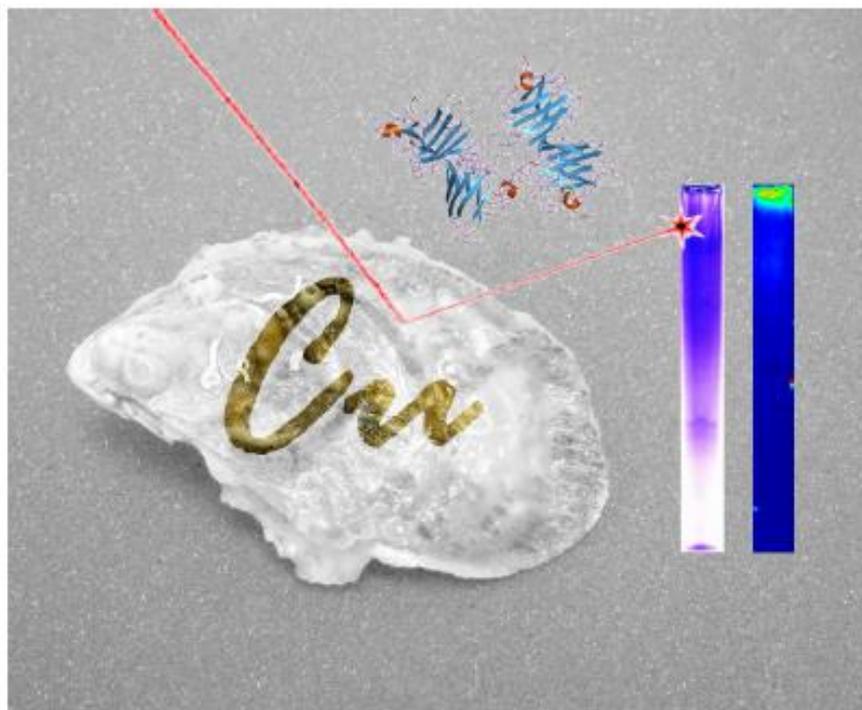
- 1 M. Devier, S. Augagneur, H. Budzinski, K. L. Menach, P. Mora, J. Narbonne, P. Garrigues, *J. Environ. Monit.* 2005, 7, 224-240.
- 2 O. Geffard, H. Budzinski, E. His, M. N. Seaman, P. Garrigues, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2002, 21, 2310-2318.
- 3 F. Quiniou, G. Damiens, M. Gnassia-Barelli, A. Geffard, C. Mouneyrac, H. Budzinski, M. Roméo, *Environ. Int.*, 2007, 33, 27-33.
- 4 L. W. Hall, R. D. Anderson, *Mar. Pollut. Bull.*, 1999, 38, 207-218.
- 5 L. M. Gaetke, C. K. Chow, *Toxicology*, 2003, 189, 147-163.
- 6 W. S. Fisher, *J. Shellfish Res.*, 2004, 23, 321-351.
- 7 J. G. Ferreira, C. Vale, C. V. Soares, F. Salas, P. E. Stacey, S. B. Bricker, M. C. Silva, J. C. Marques, *Environ. Monit. Assess.*, 2007, 135, 195-216.
- 8 M. Baudrimont, S. Lemaire-Gony, F. Ribeyre, J. Métivaud, A. Boudou, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1997, 118, 361-367.
- 9 U. K. Laemmli, *Nature*, 1970, 227, 680-685.
- 10 F. Regoli, G. Principato, *Aquat. Toxicol.*, 1995, 31, 143-164.
- 11 G. Jing, Y. Li, L. Xie, R. Zhang, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 2006, 144, 184-190.
- 12 J. Blanchard, K. Brix, M. Grosell, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 2009, 149, 531-537.
- 13 W. X. Wang, Y. Yang, X. Guo, M. He, F. Guo, C. Ke, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2011, 30, 1767-1774.
- 14 D. J. Cain, S. N. Luoma, *Hydrobiologia*, 1998, 386, 103-117.
- 15 J. S. Becker, S. Mounicou, M. V. Zoriy, J. S. Becker, R. Lobinski, *Talanta*, 2008, 76, 1183-1188.
- 16 A. Raab, B. Pioselli, C. Munro, J. Thomas-Oates, J. Feldmann, *Electrophoresis*, 2009, 30, 303-314.
- 17 L. Finney, Y. Chishti, T. Khare, C. Giometti, A. Levina, P. A. Lay, S. Vogt, *ACS Chem. Biol.*, 2010, 5, 577-587.
- 18 A. Polatajko, I. Feldmann, H. Hayen, N. Jakubowski, *Metallomics*, 2011, 3, 1001-1008.
- 19 H. Manduzio, T. Monsinjon, B. Rocher, F. Leboulenger, C. Galap, *Aquat. Toxicol.*, 2003, 64, 73-83.
- 20 E. Nozik-Grayck, H. B. Suliman, C. A. Piantadosi, *Int. J. Biochem. Cell B.*, 2005, 37, 2466-2471.
- 21 C. L. Fattman, L. M. Schaefer, T. D. Oury, *Free Radic. Biol. Med.*, 2003, 35, 236-256.
- 22 N. Itoh, Q. G. Xue, K. L. Schey, Y. Li, R. K. Cooper, J. F. La Peyre, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 2011, 158, 9-22.
- 23 F. Geret, A. Serafim, L. Barreira, M. J. Bebianno, *Mar. Environ. Res.*, 2002, 54, 413-417.
- 24 W. P. Main, C. Ross, G. K. Bielmyer, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 2010, 151, 216-221.
- 25 D. S. Chen, K. M. Chan, *Aquat. Toxicol.*, 2011, 104, 270-277.
- 26 K. G. Strothkamp, C. R. Dawson, *Biochemistry*, 1974, 13, 434-440.
- 27 M. Esaka, M. Uchida, H. Fukui, K. Kubota, K. Suzuki, *Plant Physiol.*, 1988, 88, 656-660.
- 28 M. Esaka, K. Fujisawa, M. Goto, Y. Kisu, *Plant Physiol.*, 1992, 100, 231-237.
- 29 G. Zhang, X. Fang, X. Guo, L. Li, R. Luo, F. Xu, P. Yang, L. Zhang, X. Wang, H. Qi, Z. Xiong, H. Que, Y. Xie, P. W. Holland, J. Paps, Y. Zhu, F. Wu, Y. Chen, J. Wang, C. Peng, J. Meng, L. Yang, J. Liu, B. Wen, N. Zhang, Z. Huang, Q. Zhu, Y. Feng, A. Mount, D. Hedgecock, Z. Xu, Y. Liu, T. Domazet-Lošo, Y. Du, X. Sun, S. Zhang, B. Liu, P. Cheng, X. Jiang, J. Li, D. Fan, W. Wang, W. Fu, T. Wang, B. Wang, J. Zhang, Z. Peng, Y. Li, N. Li, J. Wang, M. Chen, Y. He, F. Tan, X. Song, Q. Zheng, R. Huang, H. Yang, X. Du, L. Chen, M. Yang, P. M. Gaffney, S. Wang, L. Luo, Z. She, Y. Ming, W. Huang, S. Zhang, B. Huang, Y. Zhang, T. Qu, P. Ni, G. Miao, J. Wang, Q. Wang, C. E. Steinberg, H. Wang, N. Li, L. Qian, G. Zhang, Y. Li, H. Yang, X. Liu, J. Wang, Y. Yin, J. Wang, *Nature*, 2012, 490, 49-54.
- 30 J. J. Goto, H. Zhu, R. J. Sanchez, A. Nersissian, E. B. Gralla, J. S. Valentine, D. E. Cabelli, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 1007-1014.

- 642 31 K. J. Barnham, C. L. Masters, A. I. Bush, *Nat. Rev. Drug Discov.*,
2004, 3, 205-214.

644

Graphical Abstract

Cuproproteins in organs cytosols of pacific oyster (*Crassostrea gigas*) after waterborne Cu exposure were studied based on metallomic and proteomic strategies by gel electrophoresis (non-denaturing PAGE and SDS 2-DE) laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP MS) and electropray ionization mass spectrometry (ESI-MS).



Electronic Supplementary Information

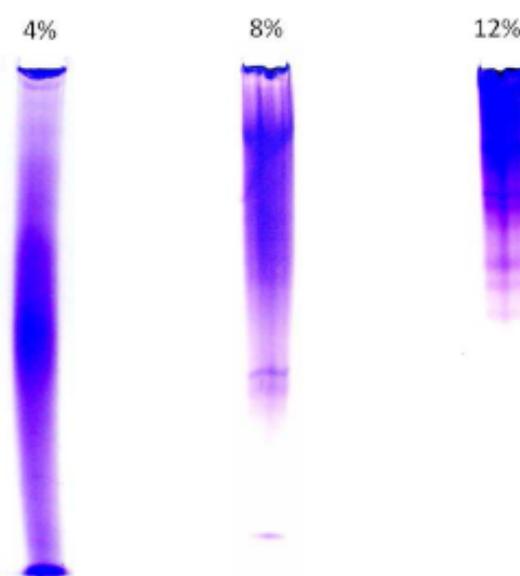
Investigating the response of cuproproteins from oyster (*Crassostrea gigas*) after waterborne copper exposure by metallomic and proteomic approachesMing Xu,^a Hugues Bijoux,^b Patrice Gonzalez,^b Sandra Mounicou^{a*}^a CNRS/UPPA, Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement, UMR5254, Hélioparc, 2 av. Pr. Angot, F-64053 Pau, France^b EA, Université Bordeaux 1, UMR EPOC 5805, Place du Docteur Bertrand Peyneau, 33120 Arcachon

Fig. S1 Three polyacrylamide gels (4%, 8% and 12%) were compared for separating the digestive gland cytosols of oyster.

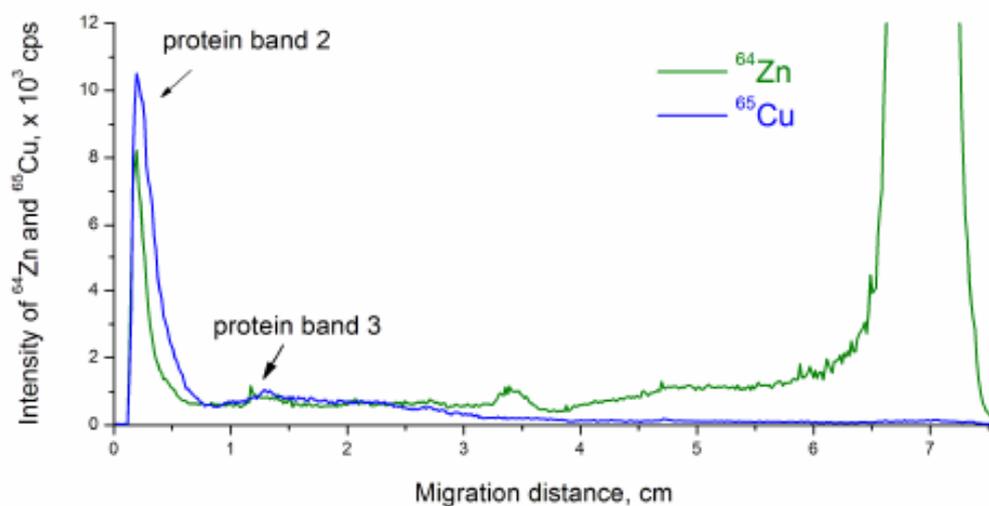


Fig. S2 ^{65}Cu and ^{64}Zn ND-PAGE-LA-ICP MS electropherograms of digestive gland cytosol from Cu-exposed oysters. The peaks marked with arrows respectively correspond to the protein band 2 and 3 in Fig. 3b and 3c. 8% polyacrylamide gel was used for separation.

Table S1. Proteins identified by ND-PAGE and μ RPC-ESI-MS/MS. ^a

Protein band ^b	No.	NCBI accession no.	Protein ^c	Score	Sequence coverage	Identified peptides
1	1	gi 405972837	Retinal dehydrogenase 1	246	22%	9
	2	gi 405964580	Actin	125	25%	9
	3	gi 405978782	Nucleoside diphosphate kinase B	123	21%	3
	4	gi 405970056	Kyphoscoliosis peptidase	104	15%	2
	5	gi 405956273	Amidase	49	9%	4
	6	gi 40643026	Ferritin	42	14%	2
	7	gi 405960663	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	27	20%	2
2	1	gi 405972837	Retinal dehydrogenase 1	746	38%	25
	2	gi 405964580	Actin	638	42%	13
	3	gi 56603668	alpha-tubulin	162	12%	3
	4	gi 405962873	Filamin-C	130	4%	11
	5	gi 405960663	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	117	13%	2
	6	gi 44885729	Arginine kinase	113	11%	2
	7	gi 53801335	beta-tubulin	100	11%	3
	8	gi 405961263	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]	80	10%	5
	9	gi 405970056	Kyphoscoliosis peptidase	65	15%	2
	10	gi 46359620	Elongation factor 1 alpha	52	5%	2
	11	gi 4838561	Heat shock protein 70	50	4%	2
	12	gi 405975242	Calponin-2	41	3%	2
3	1	gi 405972837	Retinal dehydrogenase 1	959	40%	28
	2	gi 405957058	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	353	43%	12
	3	gi 405977320	Neural cell adhesion molecule 1	334	14%	10
	4	gi 405966217	Prostaglandin reductase 1	225	9%	3
	5	gi 405978782	Nucleoside diphosphate kinase B	222	28%	4

Metallomics

6	gi 405965686	Cell adhesion molecule 4	219	14%	4
7	gi 405970867	Enolase	192	4%	3
8	gi 405978716	Alpha-actinin, sarcomeric	177	8%	6
9	gi 405950795	Non-neuronal cytoplasmic intermediate filament protein	170	15%	8
10	gi 405956520	Putative aminopeptidase	167	15%	8
11	gi 405973112	Aspartate aminotransferase	159	30%	11
12	gi 405973252	Fructose-bisphosphate aldolase	157	33%	8
13	gi 405976102	Omega-crystallin	147	11%	2
14	gi 405970056	Kyphoscoliosis peptidase	137	10%	2
15	gi 405963822	UPF0663 transmembrane protein C17orf28	107	6%	4
16	gi 405965163	Beta-hexosaminidase subunit beta	104	14%	5
17	gi 405959834	Catalase	98	17%	3
18	gi 405964580	Actin	82	26%	8
19	gi 405971457	Natterin-3	78	42%	6
20	gi 405951523	Ubiquitin	69	34%	4
21	gi 405968187	L-ascorbate oxidase	64	4%	3
22	gi 405975242	Calponin-2	62	3%	2
23	gi 405966618	Carbonic anhydrase 2	60	6%	2
24	gi 4838561	Heat shock protein 70	59	3%	2
25	gi 405967652	Hypothetical protein CGI_10017178	45	4%	2

^a NCBI nr database; ^b Protein band in Fig. 3; ^c Taxonomy is restricted to *Crassostrea gigas*.