



HAL
open science

Développement d'un nouveau bio-essai survie croissance copépodes "BASIC" : application et validation sur différentes matrices environnementales

Teddy Lesueur

► To cite this version:

Teddy Lesueur. Développement d'un nouveau bio-essai survie croissance copépodes "BASIC" : application et validation sur différentes matrices environnementales. Ecotoxicologie. Université du Havre, 2014. Français. NNT : 2014LEHA0019 . tel-01255359

HAL Id: tel-01255359

<https://theses.hal.science/tel-01255359>

Submitted on 13 Jan 2016

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.

Bien que l'écriture ne soit pas un exercice dans lequel j'excelle je tenais tout particulièrement à commencer par quelques remerciements afin de rendre grâce à toutes les personnes, qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse, en espérant n'omettre personne !

Je tenais tout d'abord à remercier les différents directeurs de laboratoire successifs du Laboratoire d'Ecotoxicologie Mileiux-Aquatiques devenu UMR-I 02 SEBIO pour m'avoir accueilli au sein de leur structure de recherche.

Monsieur François Leboulenger, je tiens à vous remercier pour m'avoir accueilli lors de mon stage de Master I et m'avoir permis de faire la connaissance de Joëlle, qui deviendra 2 ans plus tard ma directrice de thèse. Monsieur Christophe Minier et monsieur Jean Michel Danger, je tiens à vous remercier également pour m'avoir permis de continuer mes recherches lors de mon stage de Master 2 et de ma thèse.

Ensuite, je tenais à remercier l'ensemble des membres du Jury pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Je remercie mesdames Hélène Budzinski et Virginie Ducrot d'avoir bien voulu accepter cette lourde tâche qu'est de lire ce manuscrit de thèse en tant que rapporteurs.

Je tiens également à remercier l'ensemble des personnes ayant contribué à la réalisation des expérimentations dans les laboratoires d'accueil.

Je remercie aussi, l'équipe de Sami Souissi, pour m'avoir accueilli à la station marine de Wimereux, et d'avoir fait en sorte que les longues nuits d'hiver « wimereuxiennes » se passent le mieux possible.

Je remercie l'ensemble de l'équipe de Fabienne Petit, pour m'avoir formé et aidé lors des expérimentations microbiologiques.

Je remercie l'équipe d'Hélène Budzinski du LPTC, notamment Karyn et Pierre, pour leur patience, leur disponibilité et de m'avoir épaulé lors de mes séjours Bordelais, pour les dosages chimiques.

Je tiens également à remercier les personnes qui m'ont encadré et sans qui ces travaux n'auraient jamais vu le jour.

Je tiens donc à remercier Céline Boulangé-Lecomte, pour la direction scientifique de ma thèse, et de m'avoir apporté toute la rigueur nécessaire à son exécution.

Je tiens également à remercier Fabienne Petit pour la co-direction de thèse et son expertise microbiologique.

Enfin je tenais tout particulièrement à remercier Joëlle Forget-Leray. Merci de m'avoir fait confiance il y a maintenant 6 ans, de m'avoir offert la possibilité de réaliser

mon stage de master I, de master II et enfin de m'avoir sélectionné pour poursuivre ses travaux en thèse.

Je remercie tous les indispensables du LEMA, l'ensemble des professeurs, maîtres de conférences et les équipes techniques pour leur soutien et leur aide tout au long des ces années.

Enfin je remercie ma famille pour m'avoir supporté tout au long de ces quatre années et d'avoir accepté ma solitude. Je tenais à vous remercier pour tout l'amour que vous m'avez donné.

Enfin pour finir, je tiens à remercier Lola et mes parents pour y avoir cru chaque jour, et d'avoir tout donné pour la réalisation de mes rêves, merci !

Comme me l'as dit un ami, la thèse n'est que le début, alors débutons....

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEAUX.....	9
INTRODUCTION.....	11
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	16
1. Contexte réglementaire.....	17
1.1. Réglementation REACH	17
1.2. Directive Cadre sur l'Eau (DCE ; 2000/60/CE)	18
2. Contexte écologique : l'estuaire de Seine	19
3. Contaminants organiques et biologiques étudiés.....	23
3.1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)	23
3.1.1. Structure chimique et propriétés physico-chimiques.....	23
3.1.2. Sources de pollution et dispersion dans l'environnement.....	24
3.1.3. Contamination des organismes vivants et des réseaux trophiques	27
3.1.4. Effets toxiques chez les organismes aquatiques.....	27
3.2. Polychlorobiphényles (PCBs).....	30
3.2.1. Structure chimique et propriétés physico-chimiques.....	30
3.2.2. Sources de pollution et dispersion dans l'environnement.....	31
3.2.3. Contamination des organismes vivants et réseaux trophiques.....	35
3.2.4. Effets toxiques chez les organismes aquatiques.....	36
3.3. Alkylphénols (APs).....	39
3.3.1. Structure chimique et propriétés physico-chimiques.....	39
3.3.2. Sources de pollution et dispersion dans l'environnement.....	40
3.3.3. Contamination des organismes vivants et réseaux trophiques.....	41
3.3.4. Effets toxiques chez les invertébrés	41
3.4. Contaminations microbiologiques	44
4. Copépode <i>Eurytemora affinis</i>	45
4.1. Zooplancton.....	45
4.2. Systématique des copépodes.....	46
4.3. Répartition géographique et écologie du copépode <i>Eurytemora affinis</i>	49
4.3.1. Généralités	49
4.3.2. L'estuaire de Seine	50
4.4. Morphologie et clefs de détermination des calanoïdes.....	50
4.5. Reproduction et développement des calanoïdes.....	52
4.5.1. Reproduction.....	52
4.5.2. Cycle de vie.....	53
5. Utilisation des copépodes comme espèces modèles en écotoxicologie	54
5.1. Tests de toxicité aiguë.....	54
5.2. Tests de toxicité chronique	55
6. Principaux outils en écotoxicologie.....	57
6.1. Bio-essais.....	58
6.2. Biomarqueurs.....	59
6.2.1. Généralités	59
6.2.2. Chitobiase	64
MATERIEL ET METHODES.....	68
1. Sites de prélèvement / Stratégie d'échantillonnage.....	69
1.1. Prélèvement du copépode <i>Eurytemora affinis</i>	69

1.2. Prélèvement de l'eau pour les analyses microbiologiques et la détermination des paramètres physicochimiques (température, salinité).....	69
1.3. Collecte des sédiments.....	71
2. Maintien au laboratoire des copépodes	72
2.1. Culture des copépodes.....	72
2.1.1. Acclimatation-stabulation.....	72
2.1.2. Production de nouvelles générations de copépodes	72
2.2 Culture d'Algues	73
3. Enrobage et caractérisation chimique des sédiments	75
3.1. Enrobage du sédiment de référence par des composés chimiques modèles	75
3.2. Caractérisation chimique des sédiments.....	76
3.2.1. Sédiments de référence dopés.....	76
3.2.2. Sédiments naturels	77
3.2.2.1 Extraction des composés hydrophobes.....	77
3.2.2.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse	78
4. Expérimentations.....	79
4.1. Le bio-essai « BASIC » (6 jours).....	79
4.1.1. Choix des concentrations en contaminants et des sédiments.....	79
4.1.1.1. Voie d'exposition particulière (sédiments de référence dopés et sédiments naturels).....	79
4.1.1.2. Voie d'exposition dissoute (eau contaminée)	79
4.1.1.3. Expérience de colonisation.....	80
4.1.2. Principe et mise au point.....	80
4.1.2.1. Voie d'exposition particulière (sédiments de référence dopés).....	80
4.1.2.2. Voie d'exposition particulière (sédiments naturels).....	81
4.1.2.3. Voie d'exposition dissoute (eau contaminée et suspension bactérienne).....	81
4.2. Bio-essai multigénérationnel	82
4.2.1. Choix des concentrations.....	82
4.2.2. Principe du bio-essai multigénérationnel (2 mois).....	82
4.3. Marqueurs biologiques- Bio-essai BASIC	84
4.3.1. Survie.....	84
4.3.2. Croissance.....	84
4.3.3. Chitobiase	84
4.3.3.1. Principe du dosage de l'activité chitobiase (sédiments de référence dopés et naturel).....	85
4.3.3.2. Principe de l'activité chitobiase (par voie dissoute)	85
4.4. Marqueurs biologiques- Bio-essai multigénérationnel.....	86
4.4.1. Taille des individus	86
4.4.2. Stade de développement.....	86
4.4.3. Sex-ratio	86
4.4.4. Fécondité.....	86
4.5. Bactéries associées aux copépodes <i>E. affinis</i> en estuaire de Seine	87
4.5.1. Isolement des copépodes de l'estuaire de Seine	87
4.5.2. Dissociation des microorganismes des copépodes	87
4.5.2.1. Microbiote total.....	87
4.5.2.2. Microbiote externe et microbiote interne	87
4.5.3. Dénombrement des <i>Vibrio</i> sp cultivables.....	88

RESULTATS	91
1. Développement d'un bio-essai larvaire « Survie-Croissance » (BASIC) avec une matrice sédimentaire, éluviats de sédiments	92
1.1. Mise au point du bio-essai sur les éluviats de sédiments enrobés avec des molécules de référence	92
1.1.1. La survie	93
1.1.2. La croissance	95
1.2. Validation du bio-essai larvaire « survie-croissance » (test BASIC) sur des éluviats de sédiments naturels prélevés en estuaire de Seine	97
1.2.1. La survie	98
1.2.2. La croissance	101
1.2.3. Granulométrie et teneur en HAPs, OCPs et PCBs dans les sédiments naturels.....	103
1.2.4. Classification des sites selon leurs caractéristiques physico-chimiques à l'aide d'une analyse en composante principale (ACP).	105
2. Application du test BASIC par voie d'exposition dissoute.....	107
2.1. Mise au point de l'activité chitobiase	107
2.2. Survie	108
2.3. Croissance	109
2.4. Activité chitobiase	110
2.5. Développement larvaire.....	110
2.6. Effets populationnels.....	112
2.6.1. Densité et Survie	113
2.6.2. Sex-ratio	114
2.6.3. Longueur du prosome des individus adultes mâles et femelles	114
2.6.4. Fécondité.....	116
3. Application du test BASIC à une exposition microbienne	116
3.1. Distribution relative des <i>Vibrio</i> associés aux copépodes	117
3.1.1. Optimisation du protocole de dissociation des bactéries	117
3.1.2. Distribution relative des <i>Vibrio</i> sp associés aux copépodes.....	118
3.2. Application du bio-essai BASIC à une exposition bactérienne (<i>Vibrio anguillarum</i>).....	118
3.2.1. Croissance.....	119
3.2.2. Activité chitobiase	120
3.2.3. Développement larvaire	121
DISCUSSION	125
1. Test BASIC (Bioessai croissance Survie Copépode).....	127
1.1. Toxicité des HAPs.....	127
1.2. Toxicité des PCBs	131
1.3. Toxicité des Alkyphénols	133
1.4. Toxicité des sédiments naturels de l'estuaire de Seine.....	135
2. Test BASIC – Croissance et développement – Suivi Multigénérationnel	138
2.1. Test BASIC.....	139
2.2. Suivi Multigénérationnel	140
3. Microbiome – Test Basic et colonisation de <i>Vibrio</i>	142
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	144
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	149
ANNEXES.....	177
Annexes 1 : Les protocoles.....	178

Protocole de dosage de l'activité chitobiase	180
Milieu de CONWAY	184
Protocole pour la culture des algues	187
Annexes 2 : Caractérisation des sédiments naturels de l'estuaire de Seine	190
Composition physico-chimique des sédiments naturels de l'estuaire de Seine	192
Caractérisation de la contamination organique des sédiments naturels de l'estuaire de Seine	196
Caractérisation de la contamination métallique des sédiments naturels de l'estuaire de Seine	198
Annexes 3 : Les bio-tests.....	199
Mise au point du MELA	201
Application du MELA	205
Test Corophium	208
Articles	209

LISTE DES ABREVIATIONS

20-HE : 20-Hydroxyecdysone

3RSDE : Recherche - Réduction des Rejets de Substances Dangereuses dans les Eaux

4-NP : 4-NonylPhénol

ACP : Analyse en Composante Principale

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

AFSSA: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AhR : Aryl-Hydrocarbon-Receptor

APEOs : Alkylphénols-éthoxylés

APs : AlkylPhénols

BaP : Benzo(a)Pyrène

BASIC : Bio-essai croissance-Survie-Copépode

BbF : Benzo(b)Fluoranthène

BeP : Benzo(e)Pyrène

BghiP : Benzo(ghi)Pérylène

Bi : Bismuth

BkF : Benzo(k)Fluoranthène

BPC : Biphényles Polychlorés

Cd : Cadmium

CE₅₀ : Concentration pour laquelle on observe un effet de 50%

CL₅₀ : Concentration létale pour 50% des organismes

CMR : Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique

CSAH : Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine

DCB : Dichlorobenzène

DCE : Directive Cadre sur l'Eau

DEHP : DiEthylHexyl Phthalate

DHA : Dose Hebdomadaire Admissible

DJA : Dose Journalière Admissible

DMBA : DiMethylBenzoAnthracène

DMSO : Diméthylsulfoxyde

E2 : Oestradiol

ECHA : European CHemicals Agency

EcR : Récepteurs aux Ecdystéroïdes

EcREs : Ecdysone Response Elements
EDCH : Eaux Destinées à la Consommation Humaine
ERL : Effect Range Low
ERM : Effect Range Median
EXR : Ecdysteroid X Receptor
FAO: Food and Agriculture Organization
Fr : Facteur de résistance
HAPs : Hydrocarbures Aromatiques, Polycycliques
Hg : Mercure
IcdP : Indénopyrène
ICPE : Installations Classées pour la Protection de L'environnement
IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
INSU : Institut National des Science de L'univers
ISO : International Standard Organization
IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry
LPO: Ligue Pour la protection des Oiseaux
LPTC : Laboratoire de Physico et Toxico Chimie de l'Environnement
MELA : Test Embryo-Larvaire Medaka
MES : Matière en Suspension
MF : Méthylfarnésoate
MF : Masse Fraiche
MIH : Molt Inhibiting Hormone
Mo : Molybdène
MO : Organe Mandibulaire
MOIH : Mandibular Organ-Inhibiting Hormone
MS : Masse sèche
MUF : Méthylumbélliférone
MUF-NAG : Méthylumbélliféryl-N-Acétyl-Glucosamine
NAG : N-acétylglucosamine
OCP : Organochlorine Pesticides
OMS : Office Mondial de la Santé
PBDEs : Polybromodiphényléthers
PCB 126 : Polychlorobiphényle 126

PCB 153 : Polychlorobiphényle 153
PCB-DL : PCBs Dioxin Like
PCBi : PCBs indicateurs
PCB-NDL : PCBs Non Dioxin Like
PCBs : PolyChloroBiphényles
PCP : Pentachlorophénol
PE : Perturbateur Endocrinien
PHE : Phenanthrène
PNEC (predicted no effect concentration)
POCs : Pesticides Organochlorés
POPs : Polluants Organiques Persistants
Ppi : Pyrophosphate inorganique
PS : Poids Sec
PSU : Pratical Salinity Unit
PVC : Polychlorure de Vinyle
REACH : Registration, Evaluation and Authorization of CHemicals
RNO : Réseau National d'Observation
RXR : Retinoid X Receptor
Scale : Science Appliquée à l'Environnement
SEQ-eau : Seuil d'Evaluation de la Qualité physicochimique des eaux
SG : Glande du Sinus
SNS : Service de la Navigation de la Seine
STEPs : Stations d'Épurations
TCBS : Thio-Citrate-Bile-Sucrose Agar
TEQ: Toxic Equivalent Quantity
TSA : Trypsic Soy Agar
US EPA : United State Environmental Protection Agency
USP : Ultraspiracle
UV : Ultra-violet
Vtg : Vitellogénine
XO : Organe X
YO : Organe Y

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : L'estuaire de Seine (Guezennec, 2009).....	22
Figure 2 : Distribution moyenne des HAPs dans les matières organiques en suspension (MES) à Poses en 2005 (Lachambre & Fisson, 2007a).....	26
Figure 3 : Origine de la contamination en HAPs (14 molécules) dans l'estuaire de Seine en 2003.....	26
Figure 4 : Structure générale des PCBs.....	31
Figure 5 : Synthèse des PCBs.....	32
Figure 6 : Liste des 7 PCBs prioritaires définie par le BCR-CEE (Bureau Communautaire de Référence).....	33
Figure 7 : Contamination en PCB 153 des sédiments de la Bouille, Oissel et Poses de 1995 à 2005 (Service de la Navigation de la Seine (SNS) ; Lachambre & Fisson, 2007b).....	34
Figure 8 : Profil de contamination par les PCBs des sédiments de Oissel en 2003 (année très contaminée). Ce profil est similaire à ceux des autres années de forte contamination (Service de la Navigation de la Seine (SNS) ; Lachambre & Fisson, 2007b).....	35
Figure 9 : Synthèse des alkylphénols (Cailleaud, 2006).....	39
Figure 10 : Voie de dégradation des APEOs (Cailleaud, 2006).....	41
Figure 11 : Phylogénie des copépodes (Devreker, 2007).....	47
Figure 12 : Les différentes classes de copépodes (1 : platycopioïda, 2 : calanoïda, 3 : misophrioïda, 4 : gelyelloïda, 5 : cyclopoïda, 6 : harpacticoida, 7 : mormonilloïda, 8 : poecilostomatoida, 9 : siphonostomastoida, 10 : monstrilloïda. http://www.obs-vlfr.fr).....	48
Figure 13 : Répartition géographique des copépodes (http://copepodes.obsbanyuls.fr/en/index.php). 3 : Subantarctique 293 espèces, 4 : Antarctique 296 espèces, 5 : Afrique du Sud 454 espèces, 6 : Golf de Guinée 341 espèces, 7 : Mer des Antilles 716 espèces, 8 : Ile du Cap Vert 745 espèces, 9 : Irlande 381 espèces, 10 : Islande du Sud 204 espèces, 11 : Cap Cod 261 espèces, 12 : Atlantique Sud Central 329 espèces, 13 : Brésil Argentine 381 espèces, 14 : Mer Noire - Mer méditerranée 559 espèces, 15 : Mer Rouge 259 espèces, 16 : Océan Indien 964 espèces, 17 : Golf de Thaïlande 635 espèces, 18 : Australie 518 espèces, 19 : Pacifique Tropical Central 535 espèces, 20 : Pacifique Tropical Est 481 espèces, 21 : Mer de Chine 608 espèces, 22 : Mer du Japon 679 espèces, 23 : Pacifique Nord Ouest 353 espèces, 24 : Pacifique Nord est 292 espèces, 25 : Golf de Californie 440 espèces, 26 : Chili 435 espèces, 27 : Océan Arctique 177 espèces.....	48
Figure 14 : Morphologie externe et appendices d'un copépode calanoïde femelle (d'après Mauchline, 1998). Le métasome est délimité en 5 segments bien définis (1-5). Chaque segment comporte une paire de pattes (leg 1-5). La 5ème paire de pattes est généralement différenciée entre le male et la femelle.....	52
Figure 15 : Cycle de reproduction du copépode <i>E. affinis</i> (adapté d'après Dur et al, 2009).....	53

Figure 16 : Cycle de développement d'un copépode calanoïde. Ni et Ci correspondent respectivement aux différents stades larvaires i.e .nauplii et juvéniles i.e.copépodites (d'après Katona, 1971 et modifié par Souissi S.).....	54
Figure 17 : Diagramme d'Adams et al, 1989.	58
Figure 18 : Représentation des méthodologies faisant appel à l'utilisation des biomarqueurs dans l'évaluation des risques écotoxicologiques (Lagadic et al, 2007).	60
Figure 19 : Représentation schématique de l'évolution du rôle des biomarqueurs en fonction de la concentration en toxique ou de la durée d'exposition (d'après Depledge, 1994).	62
Figure 20 : Représentation des différents facteurs pouvant affecter la mesure d'un biomarqueur.....	64
Figure 21 : Voie de synthèse de la chitobiase chez les crustacés (XO = Organe X, YO = organe Y, MF = méthylfarnésolate, MO= Organe Mandibulaire MOIH = Mandibular organ-inhibiting hormone MIH= Molt inhibiting Hormone, SG= Glande du sinus, EXR/RXR =récepteur aux ecdystéroïdes).	65
Figure 22 : Photographie satellite du site de prélèvement des organismes à Tancarville (Estuaire de Seine, France).	70
Figure 23 : Prélèvement d'eau de l'estuaire de Seine à l'aide d'une bouteille Niskin (Crédit photo, laboratoire M2C).....	70
Figure 24 : Séparation des copépodes <i>E. affinis</i> de la matière en suspension (MES) au laboratoire (photos Cailleaud, 2006).....	71
Figure 25 : Localisation des sites de prélèvement des sédiments (encadrés) en estuaire de Seine (France ; Deloffre. J).	72
Figure 26 : Production d'une génération F1 de copépodes <i>E. affinis</i> au laboratoire... 73	73
Figure 27 : Culture d'algues pour le nourrissage des copépodes <i>E. affinis</i> . (A) Observation microscopique de l'algue <i>Tahiti Isochrysis</i> . (B) Observation microscopique de l'algue <i>Rhodomonas salina</i> . (C) Observation stéréomicroscopique d'un copépode <i>E. affinis</i> après nourrissage. L'algue <i>R. salina</i> peut-être observée dans le tube digestif du copépode (www.ifremer.fr , www.novia.fi).	74
Figure 29 : Dispositif mis en place au laboratoire pour la culture des algues <i>T.Isochrysis</i> et <i>R. salina</i>	74
Figure 28 : Culture des algues <i>R. Salina</i> et <i>T. isochrysis</i> en ballons.....	75
Figure 30 : Principe du bio-essai larvaire BASIC.	81
Figure 31 : Synchronisation des femelles <i>E. affinis</i> et obtention de la génération F0. 83	83
Figure 32 : Principe du bio-essai multi-générationnel.....	83
Figure 33 : Principe du dosage de l'activité chitobiase.	86
Figure 34 : Isolement des copépodes du prélèvement d'eau et dissociation des microorganismes : Microbiote total, microbiote interne, microbiote associée à la cuticule).....	89
Figure 35 : Etape de filtration etcopépodes sur filtres après l'étape obtenue par séparation den phototropisme.....	89
Figure 36 : Survie larvaire (n =10, 3 réplicats) lors d'une exposition de 6 jours à des éluviats sédiments enrobés aux HAPs (A : BaP ; B : PHE ; C : DMBA). Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal-Wallis ; p<0,05).....	94
Figure 37 : Survie larvaire (n= 10, 3 réplicats) lors d'une exposition de 6 jours à des sédiments enrobés aux PCBs (A : PCB 126 ; B, PCB 153). Le dessin d'un nauplius	

indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal-Wallis ; $p < 0,05$).....	94
Figure 38 : Survie larvaire (n= 10, 3 réplicats) lors d'une exposition de 6 jours à des sédiments enrobés aux 4-NP. Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal-Wallis ; $p < 0,05$). 95	
Figure 39 : Croissance larvaire (n= 30-50) lors d'une exposition de 6 jours à des sédiments enrobés aux HAPs (A : BaP ; B, PHE ; C DMBA). Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal- Wallis ; $p < 0,05$).....	96
Figure 40 : Croissance larvaire (n= 30-50) lors d'une exposition de 6 jours à des sédiments enrobés aux PCBs (A : PCB 126 ; B, PCB 153). Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal- Wallis ; $p < 0,05$).....	97
Figure 41 : Croissance larvaire (n= 30-50) lors d'une exposition de 6 jours à des sédiments enrobés aux 4-NP. Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal-Wallis ; $p < 0,05$). 97	
Figure 42 : Survie larvaire (n=10, 3 réplicas) lors d'une exposition de 6 jours à des éluutriats de sédiments naturels provenant de l'estuaire de Seine (A : février, B : Décembre). Les lettres (a, b) indiquent une différence significative en comparaison avec le sédiment de référence (Yville-sur-Seine) (Test de Tuckey ; $p < 0,05$).....	99
Figure 43 : Survie larvaire (n=10, 3 réplicas) lors d'une exposition de 6 jours à des éluutriats de sédiments naturels provenant de l'estuaire de Seine (C : Août, D : Mai). Les lettres (a, b) indiquent une différence significative en comparaison avec le sédiment de référence (Yville-sur-Seine) (Test de Tuckey ; $p < 0,05$).....	100
Figure 44 : Croissance larvaire (n=30-50) lors d'une exposition de 6 jours à des éluutriats de sédiments naturels provenant de l'estuaire de Seine (A : février, B : Décembre). Les lettres (a, b) indiquent une différence significative en comparaison avec le sédiment de référence (Yville-sur-Seine) (Test de Tuckey ; $p < 0,05$).....	102
Figure 45 : Croissance larvaire (n=30-50) lors d'une exposition de 6 jours à des éluutriats de sédiments naturels provenant de l'estuaire de Seine (C : Août, D : Mai). Les lettres (a, b) indiquent une différence significative en comparaison avec le sédiment de référence (Yville-sur-Seine) (Test de Tuckey ; $p < 0,05$).....	103
Figure 46 : Analyse des relations entre les paramètres chimiques et physiques des sédiments naturels de l'estuaire de la Seine à l'aide d'une analyse en composantes principales (ACP). Six variables (HAPs, PCBs, OCPs, argile limon et sable) pour chaque site d'échantillonnage (Pont de Normandie, Quillebeuf-sur-Seine, Caudebec-en-Caux, La Bouille, Oissel et Poses) ont été incluses dans l'ACP. (A) Pourcentage d'inertie. (B) Cercle de corrélation des 6 variables en fonction des deux premiers axes représentant 92,9 % d'inertie. (C) Heatmap des propriétés physico-chimiques des sédiments naturels de l'estuaire de la Seine. Plus la couleur est intense, moins la variable est exprimée. Les dendrogrammes secondaires ont été calculés en utilisant une méthode de classification UPGMA.....	106
Figure 47 : Mesure de l'activité enzymatique (chitobiase) en fonction de la concentration en substrat (MUFNAG, méthyl-umbélliféryl N-acetyl-glucosamine) chez les nauplii d' <i>Eurytemora affinis</i>	108
Figure 48 : Survie larvaire (n= 10, 3 réplicas) lors d'une exposition de 2, 4 et 6 jours à deux contaminants en solution (PCB 126 et 4-NP). Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal-Wallis ; $p < 0,05$).....	109

Figure 49 : Croissance larvaire (n= 30-50) lors d'une exposition de 2, 4 et 6 jours à deux contaminants en solution (4-NP et PCB 126). Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal-Wallis ; p<0,05).....	109
Figure 50 : Activité chitobiase après 2, 4 et 6 jours d'exposition à deux contaminants (4-NP et PCB 126). Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal-Wallis ; p<0,05).....	110
Figure 51 : Répartition des stades larvaires chez les témoins et après 2 jours d'exposition à deux contaminants (4-NP et PCB 126).....	111
Figure 52 : Répartition des stades larvaires chez les témoins et après 4 jours d'exposition à deux contaminants (4-NP et PCB 126).....	112
Figure 53 : Répartition des stades larvaires et copépodites chez les témoins et après 6 jours d'exposition à deux contaminants (4-NP et PCB 126).	112
Figure 54 : Nombre d'individus sur 3 générations après exposition à deux contaminants (4-NP, PCB 126) dans un volume donné (densité).	113
Figure 55 : Evolution du sex-ratio sur 3 générations de copépodes d' <i>E. affinis</i> chez les témoins et après exposition à deux contaminants (4-NP, PCB 126).	114
Figure 56 : Evolution de la longueur moyenne du prosome des copépodes au stade adulte d' <i>E. Affinis</i> sur 3 générations successives chez les témoins et après exposition à deux contaminants (PCB 126 et 4-NP). Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin (kruskal-Wallis ; p<0,05).....	115
Figure 57 : Evolution de la fécondité moyenne des femelles chez le copépode <i>E. affinis</i> au cours de 3 générations successives, après exposition à deux contaminants (4-NP, PCB 126). Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin (Kruskal-Wallis ; p<0,05).....	116
Figure 58 : Dissociation de la flore bactérienne associée aux copépodes (<i>Eurytemora affinis</i>) : optimisation du temps de traitement aux ultra sons (20 kHz ; 20W).....	117
Figure 59 : Distribution relative des <i>Vibrio</i> associés aux copépodes.	118
Figure 60 : Croissance larvaire (n= 30-50) lors d'une exposition de 2 jours d'exposition de <i>Vibrio anguillarum MC049</i> . Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin (Kruskal-Wallis ; p<0,05)...	119
Figure 61 : Croissance larvaire (n= 30-50) lors d'une exposition de 4 jours d'exposition à <i>Vibrio anguillarum MC049</i> . Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin (Kruskal-Wallis ; p<0,05)...	119
Figure 62 : Croissance larvaire (n= 30-50) lors d'une exposition de 6 jours d'exposition à <i>Vibrio anguillarum MC049</i> . Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin (Kruskal-Wallis ; p<0,05)...	120
Figure 63 : Activité chitobiase des nauplii d' <i>E. affinis</i> après 2 jours d'exposition à <i>Vibrio anguillarum MC049</i> . Le dessin d'un Nauplii indique une différence significative par rapport au témoin (Kruskal-Wallis ; p<0,05).	120
Figure 64 : Activité chitobiase des nauplii d' <i>E. affinis</i> après 4 jours d'exposition à <i>Vibrio anguillarum MC049</i> . Le dessin d'un Nauplii indique une différence significative par rapport au témoin (Kruskal-Wallis ; p<0,05).	121
Figure 65 : Activité chitobiase des nauplii d' <i>E. affinis</i> après 6 jours d'exposition à <i>Vibrio anguillarum MC049</i> . Le dessin d'un Nauplii indique une différence significative par rapport au témoin (Kruskal-Wallis ; p<0,05).	121
Figure 66 : Répartition des stades larvaires après 2 jours d'exposition à deux concentrations de <i>Vibrio anguillarum MC049</i>	122

Figure 67 : Répartition des stades larvaires après 4 jours d'exposition à deux concentrations de <i>Vibrio anguillarum</i> MC049.	122
Figure 68 : Répartition des stades larvaires après 6 jours d'exposition à deux concentrations de <i>Vibrio anguillarum</i> MC049.	123
Figure 69 : Distribution des tailles de particules des sédiments naturels collectés en février 2009 en estuaire de Seine.....	192
Figure 70 : Distribution des tailles de particules des sédiments naturels collectés en février 2009 en estuaire de Seine (A Pont de Normandie, B Quillebeuf-sur-Seine, C Caudebec-en-caux, D La Bouille, E Duclair, F Oissel, G Poses).	193
Figure 71 : Concentration en HAPs des sédiments naturels prélevés en février 2009 en estuaire de Seine.	196
Figure 72 : Survie larvaire chez le medaka japonais exposé pendant 10 jours à des sédiments enrobés (A, DMBA et NaP ; B, PCB 126 et PCB 153). Astérix indique une différence significative par rapport au contrôle ($p < 0,05$, test de Tukey).....	202
Figure 73 : Croissance larvaire chez le medaka japonais exposé pendant 10 jours à des sédiments enrobés (A, DMBA et NaP ; B, PCB 126 et PCB 153). Astérix indique une différence significative par rapport au contrôle ($p < 0,05$, test de Tukey).....	203
Figure 74 : Mortalité A et croissance B mesurée sur les larves de medaka à l'éclosion, suite à l'exposition à des sédiments naturels de l'estuaire de Seine (Bleu foncé estuaire amont, bleu clair estuaire aval). Astérix indique une différence significative par rapport au contrôle ($p < 0,05$ test de Tukey).....	206
Figure 75 : Toxicité aigüe sur l'amphipode <i>Corophium arenarium</i> . Les résultats sont exprimés en pourcentage de mortalité observée.....	208

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Données écotoxicologiques à produire pour l'enregistrement des composés chimiques dans le cadre de la réglementation REACH (CE/1907/2006). ..	18
Tableau 2 : Annexe X de la directive n° 2013/39/UE du 12/08/13 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau.....	20
Tableau 3 : Les 16 HAPs classés prioritaires par l'US EPA.	24
Tableau 5 : les différentes sources des HAPs.....	25
Tableau 4 : Les 9 HAPs classés comme dangereux pour la santé humaine par l'OMS.	25
Tableau 6 : CL50 relevées dans la littérature chez différents organismes aquatiques lors d'exposition aux HAPs. (a 24 h, b 48 h, c 72 h, d 96 h).	29
Tableau 7 : Propriétés physico-chimiques des 7 PCBs les plus étudiés en estuaire de Seine (Lachambre & Fisson, 2007b). Les Koc et Kp sédiments ont été déterminés à partir de mesures réalisées sur l'estuaire de Seine (ATSDR, 2000 - PCB ; van Wezel, 1999 ; Munschy et al, 1996 ; Sander, 1999 ; Birnbaum, 1985 ; SRC).....	31
Tableau 8 : Flux annuels des 7 PCBi en estuaire de Seine à Poses entre 1999 et 2004 (Lachambre & Fisson, 2007b).....	34
Tableau 9 : Concentrations de PCB153 ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ de masse sèche) chez différentes espèces de l'estuaire de Seine en 1996 et 1997 (Abarnou et al, 2000).	35
Tableau 10 : Facteur de bioaccumulation (FCB) de deux congénères (PCB 118 et PCB 153) chez différents organismes ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ de Masse Fraîche ; Van Wezel et al, 1999 in Lachambre & Fisson, 2007b).	36
Tableau 11 : CL50, 96h relevées dans la littérature chez différents organismes aquatiques lors d'exposition aux PCBs.....	38
Tableau 12 : Propriétés physico-chimiques de l'octylphénol et du nonylphénol et facteur de bioconcentration chez les organismes aquatiques (Becue & Nguyen, 2005 ; E.U., 2002 ; Johnson et al, 2000 in Lachambre & Fisson, 2007).....	39
Tableau 13 : Valeurs de CL ₅₀ , 96h relevées dans la littérature chez différents organismes aquatiques lors d'exposition aux APs.....	43
Tableau 14 : Valeurs de CL50 en $\mu\text{g.L}^{-1}$ (noir, eau) et $\mu\text{g.g}^{-1}$ (bleu, sédiment) déterminées chez des copépodes et relevées dans la littérature.....	56
Tableau 15 : Exemples de biomarqueurs utilisés en écotoxicologie en fonction du niveau d'organisation biologique étudié (d'après Vasseur et Cossu-Leguillée, 2003).	59
Tableau 16 : Principaux biomarqueurs selon d'OSPAR (d'après Vasseur et Cossu-Leguillée, 2003).	61
Tableau 17 : Paramètres abiotiques mesurés lors des prélèvements pour l'analyse du microbiote du copépode <i>E. affinis</i> en estuaire de Seine.....	70
Tableau 18 : Concentrations nominales et concentrations mesurées exprimées en ng.g^{-1} de sédiment sec. X représente la concentration environnementale.	77
Tableau 19 : Contaminants et concentrations testées lors du bio-essai multigénérationnel avec <i>E. affinis</i>	82
Tableau 20 : Survie et Croissance nauplienne (n =10, 3 répliques) lors d'une exposition de 6 jours à des éluviats de sédiments considérés comme témoins : (i) Témoin : sédiment provenant du site d'Yville-sur-Seine ;(ii) Témoin Solvant : sédiment d'Yville-	

sur-Seine associé au DMSO. Les analyses statistiques ont été réalisées par le test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).....	93
Tableau 21: Granulométrie des sédiments prélevés en estuaire de Seine en Février 2009.	104
Tableau 22 : teneur en HAPs, PCBs et OCPs des sédiments prélevés en estuaire de Seine en Février 2009.	104
Tableau 23 : Composition en carbone, hydrogène, azote et ratio C/N des sédiments naturels de l'estuaire de Seine collectés en février 2009.....	194
Tableau 24 : Contamination métallique des sédiments naturels prélevés en février 2009 en estuaire de Seine.....	198

INTRODUCTION

La vie, c'est comme une bicyclette, il faut avancer pour ne pas perdre l'équilibre (Albert Einstein)

Au cours de la seconde moitié du XX^e siècle, la chimie a connu un essor remarquable. De nouveaux procédés de synthèse ont permis l'élaboration de nouveaux composés tels que des engrais, des pesticides ou encore des matières plastiques utilisés dans les activités industrielles, agricoles, urbaines et domestiques. La diversité des substances chimiques rejetées dans l'environnement n'a cessé de croître. Ces substances d'origine anthropique sont définies comme contaminants lorsqu'elles sont rejetées dans le milieu naturel, et qualifiées de polluants si elles exercent des effets défavorables sur le plan biologique, (Moriarty, 1990) (Butler & Lowe, 1978). Ces substances sont majoritairement des xénobiotiques, molécules chimiques de synthèse étrangères à l'organisme et à la biosphère, dont la toxicité à faible concentration est avérée.

Quelles que soient les sources de contamination, et les modalités de rejets dans l'environnement, les milieux aquatiques, notamment les estuaires et les océans, constituent les réceptacles terminaux où se concentrent ces substances ou leurs produits de dégradation. Les estuaires, zone de transition entre les eaux douces continentales et les eaux marines, sont les exutoires terminaux des contaminants issus des bassins versants auxquels s'ajoutent les apports d'origine atmosphérique.

Les écosystèmes estuariens sont des zones d'une grande richesse écologique, avec une forte productivité biologique, qui explique leur rôle clé dans l'équilibre de nombreux processus écologiques. Ainsi, les estuaires hébergent des zones de nourricerie pour de nombreuses espèces de poissons marins, et constituent des lieux de transit essentiels et des couloirs de circulation pour les oiseaux migrateurs. Dans les pays industrialisés les estuaires, sont également un facteur important du développement de l'activité économique avec un trafic maritime liés aux activités industrielles et agricoles, et l'urbanisation de leurs bassins versants. L'ensemble de ces activités exerce une forte pression anthropique qui contribue à fragiliser cet écosystème, particulièrement la contamination due aux rejets des substances chimiques de synthèse. Aujourd'hui, la préservation des écosystèmes estuariens, tout en permettant le développement économique est devenu un enjeu sociétal et environnemental majeur.

Depuis quelques décennies, la prise de conscience générale de la dégradation des écosystèmes a conduit les scientifiques à mener des études sur les sources d'émission de contaminants, leurs devenir dans l'environnement et leurs effets sur les biocénoses, pour évaluer le risque environnemental. Au regard de leur toxicité, parmi l'ensemble des contaminants chimiques détectés dans les estuaires dont le bassin versant est fortement anthropisé, certaines classes de molécules sont plus préoccupantes. Ainsi, les polluants organiques persistants (POPs), et les substances chimiques faiblement biodégradables, possèdent des propriétés physico-

chimiques qui leur confèrent un fort potentiel de bioaccumulation chez les organismes. Ces contaminants peuvent induire des effets à court ou à long terme (Burton, 1992), constituant un risque environnemental permanent tant sur le plan écologique que sanitaire (McCauley et al, 2000).

Dans le milieu estuarien, une grande partie de ces composés s'adsorbent sur les matières en suspension (MES) et suivent la dynamique particulière spécifique de cet environnement. Ainsi, les particules fines et les contaminants chimiques associés s'accumulent dans la zone de turbidité maximale (bouchon vaseux), localisée à l'embouchure en période d'étiage, et se déposent sur les vasières où se concentrent les sédiments contaminés. Ces zones de dépôts sédimentaires constituent de véritables réservoirs de contaminants chimiques et microbiologiques menaçant la santé des écosystèmes aquatiques. La toxicité des POPs à la fois pour la santé humaine et les écosystèmes aquatiques ont conduit l'Europe à mettre en place la Directive Cadre sur l'Eau (DCE ; 2000/60/CE). Cette directive vise à (i) atteindre un bon état écologique des eaux en 2015, (ii) réduire progressivement les rejets, émissions ou pertes pour les substances prioritaires et (iii) supprimer les rejets d'ici à 2021 des substances classées prioritaires dangereuses (directive 2013/39/UE modifiant les directives 2000/60/CE ; directive 2008/105/CE pour les substances prioritaires dans le domaine de l'eau). En complément, le règlement européen REACH (*Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals* ; CE/1907/2006), du 1^{er} juin 2007, a pour objectif (i) d'améliorer la connaissance des propriétés intrinsèques des substances chimiques et des risques liés à leur utilisation, et (ii) de mettre en place une politique de substitution des substances les plus préoccupantes.

Dans ce contexte, il devient important d'évaluer les risques liés à la présence de contaminants chimiques dans l'environnement. L'écotoxicologie s'avère une science incontournable pour (i) évaluer les impacts et les effets de polluants sur les différentes populations d'un écosystème avant la mise en place des mesures de préventions et (ii) comprendre et modéliser les mécanismes de contamination d'un milieu naturel. De plus, lors de contaminations multiples, la seule analyse chimique de la matrice (eau, sédiments, particules en suspension), ne permet pas d'évaluer les effets de synergie ou d'additivité. L'étude des réponses biologiques des organismes exposés à ces contaminations permet d'effectuer un diagnostic de la qualité des milieux.

L'outil biologique le plus classiquement utilisé à des fins de diagnostic environnemental est l'essai biologique (ou bio-essai). Les bio-essais convertissent les concentrations en polluants, en effets mesurables sur des variables biologiques d'organismes vivants en milieu contrôlé lors d'expositions à différentes matrices contaminées (Bessi & El Alami, 2009). Les variables mesurées

lors des bio-essais peuvent être des paramètres sub-individuels (e.g. biomarqueurs) ou individuels (e.g. croissance, survie). Ces variables permettent d'alimenter des modèles prédictifs d'effet sur la dynamique des populations, mais ne permettent pas de caractériser directement l'état de santé d'un écosystème. Les bio-essais peuvent également s'intéresser à des paramètres populationnels sur plusieurs générations et plus intégratifs au sens écologique, tel que le sex-ratio, la fécondité et la fertilité. Depuis les années 2000, les copépodes sont couramment utilisés dans les bio-essais sédiments, *Amphiascus tenuiremis* (Hagopian-Schlekat et al, 2001 ; Bejarano & Chandler, 2003), *Nitocra spinipes* (Simpson & Spadaro, 2011 ; Perez-Landa & Simpson, 2011), *Schizopera knabeni* (Fleeger et al, 2007) et *Tisbe battagliai* (Hutchinson et al, 1999). Toutefois, peu de bio-essais ont été développés pour évaluer la contamination chimique des zones de transition comme les écosystèmes estuariens, pour lesquels la dynamique de contamination est spécifique.

L'estuaire de Seine est un des estuaires les plus anthropisés d'Europe, avec un bassin versant qui abrite près de 26% de la population française et 40% de l'activité agricole et industrielle du pays, notamment l'industrie pétrochimique et pharmaceutique. Toutefois, en dépit de la contamination chimique et microbiologique importante, un microcrustacé zooplanctonique, le copépode *Eurytemora affinis* (*E. affinis*) se développe en abondance dans l'estuaire.

Ces travaux de thèse ont été conduits dans le cadre du projet TOXSEINE et COBAC, soutenu par le programme Seine-aval IV et la Structure Fédérative de Recherche « Sciences Appliquées à L'Environnement » (SCALE 4116) et s'inscrivent dans le thème « risques chimiques et environnementaux ».

L'objectif de mes travaux était de développer des outils indicateurs de perturbation en lien avec de grandes fonctions biologiques et susceptibles *in fine* d'impacter la fitness des organismes. Les efforts ont été focalisés sur l'étude des effets de la contamination environnementale, à la fois chimique et bactérienne, sur la survie, la croissance et la fitness de l'espèce zooplanctonique emblématique de estuaire de Seine, le copépode *E. affinis* (réponses individuelles et populationnelles). Cette étude avait également pour objectif de fournir quelques éléments de réponse permettant d'expliquer la formidable densité de cette espèce en estuaire de Seine. Un « Bio-essai croissAncE-SurvIe-Copépode » (BASIC) sur la phase larvaire nauplius a ainsi été développé. Les effets de ces contaminants ont été étudiés à différents niveaux d'organisation biologique chez ce copépode, depuis le niveau moléculaire jusqu'à l'échelle de la population. L'utilisation de diverses matrices avait pour objectif de mesurer les effets des contaminants au travers de voies de transfert différentes.

Dans un premier temps, le travail a consisté à développer le bio-essai BASIC à l'aide de sédiments de référence enrobés avec des composés chimiques modèles, appartenant à différentes classes de composés caractéristiques de la contamination chimique en estuaire de Seine tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) *i.e.* benzo(a)pyrene (BaP), dimethylbenzoanthracène (DMBA) et phénanthrène (PHE), les polychlorobiphényles (PCBs) *i.e.* PCB 126 et PCB 153, et les alkylphénols (APs) *i.e.* 4-nonylphénol (4-NP).

Dans un second temps, le bio-essai BASIC a été validé à l'aide de sédiments naturels provenant de sites distincts le long du transect amont-aval de l'estuaire de Seine échantillonnés tous les 3 mois sur une année. La survie et la croissance ont été mesurées après 6 jours d'exposition aux différentes matrices sédimentaires. En parallèle, un nouveau biomarqueur a été développé en lien avec la croissance, l'activité de l'enzyme chitobiase, dont les niveaux d'activité varient lors des successions de phases de développement au cours de la vie des crustacés.

Dans un troisième temps, le bio-essai BASIC a été utilisé au laboratoire pour évaluer les effets du PCB 126 et du 4-NP en solution dans l'eau sur la survie, la croissance et le développement larvaire avec la détermination, pour chaque individu exposé, de son stade de développement nauplien ou copépodite. De plus, les effets populationnels comme la densité, la fécondité et le sex-ratio ont été analysés sur plusieurs générations (F1 et F2).

Enfin, des analyses *in situ* du microbiome associé au copépode *E. affinis* en estuaire de Seine, plus particulièrement sur le genre *Vibrio spp* ont été menées. Le bio-essai BASIC, développé et validé, a alors été appliqué pour évaluer l'impact d'une exposition des nauplii *E. affinis* à *Vibrio anguillarum*.

L'objectif à terme serait d'évaluer les capacités d'acclimatation/adaptation du copépode exposé à une multi-contamination chimique et microbiologique chronique dans son milieu naturel.

CHAPITRE 1 :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Il est hélas devenu évident aujourd'hui que notre technologie a dépassé notre humanité (Albert Einstein)

1. Contexte réglementaire

1.1. Réglementation REACH

Face à l'augmentation de la pollution, la gestion de l'état de santé des écosystèmes est devenue un enjeu majeur ces dernières années. Les institutions européennes, notamment le Parlement européen et le Conseil de l'Union européenne ont donc décidé de mettre en place un nouveau règlement permettant l'enregistrement et l'autorisation des substances mises sur le marché européen à plus d'une tonne par an, portant l'acronyme REACH (Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals). Une première proposition de règlement, formulée le 17 novembre 2005 a été adoptée en seconde lecture le 13 décembre 2006 (CE/1907/2006). Enfin, c'est en juin 2007 que le règlement REACH est entré en vigueur. Ce règlement vise à améliorer les connaissances des propriétés intrinsèques (propriétés physico-chimiques) des substances chimiques et à mieux maîtriser les risques associés à leurs utilisations. Ce règlement concerne les nouvelles substances mises sur le marché et également les plus anciennes depuis 1981. En effet, c'est en 1981 que la distinction entre nouvelles et anciennes substances a été mise en place. Le règlement REACH se décline en 4 procédures :

- L'enregistrement des substances produites ou importées de plus d'une tonne par an,
- l'évaluation des dossiers par l'Agence européenne des produits chimiques (ECHA) mise en place le 29 octobre 2003,
- l'autorisation des substances dites extrêmement préoccupantes dans le cadre d'utilisations particulières,
- et la restriction de toute substance entraînant un risque inacceptable.

Les informations à fournir dans le dossier dépendent du tonnage annuel. La démonstration de l'innocuité de la substance doit être apportée par l'industriel lui-même. Pour les substances produites ou importées à plus de cent tonnes par an, différents tests de toxicité doivent être appliqués (tableau 1).

Tableau 1 : Données écotoxicologiques à produire pour l'enregistrement des composés chimiques dans le cadre de la réglementation REACH (CE/1907/2006).

	Tonnage annuel			
	1 à 10 tonnes	10 à 100 tonnes	100 à 1000 tonnes	plus de 1000 tonnes
test de la toxicité aiguë	oui	oui	oui	oui
test d'irritation cutanée et oculaire	oui	oui	oui	oui
test de sensibilisation cutanée	oui	oui	oui	oui
test d'Ames	oui	oui	oui	oui
étude de la toxicité par administration répétée		oui	oui	oui
test de reprotoxicité <i>in vitro</i>		oui	oui	oui
test de mutagénicité <i>in vitro</i>			oui	oui
étude de la toxicité subchronique			oui	oui
test embryo-larvaire			oui	oui
étude complémentaire de la génotoxicité				oui
étude de la toxicité à long terme				oui
étude multigénérationnelle				oui
étude de carcinogénicité				oui

1.2. Directive Cadre sur l'Eau (DCE ; 2000/60/CE)

Les écosystèmes les plus impactés par la pollution sont les écosystèmes aquatiques, considérés comme étant les réceptacles ultimes des polluants. Les premières mesures visant à améliorer la qualité des eaux ont été développées dans les années 1950 afin de restaurer la qualité des eaux de surface et la vie piscicole. Des mesures en 1970 ont complété ces actions en réduisant le rejet de substances toxiques dans les masses d'eau. Le 23 octobre 2000, le Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie a instauré la Directive Cadre sur l'Eau (DCE ; 2000/60/CE) concernant la protection des ressources en eaux douces, saumâtres ou salées, superficielles ou souterraines, de transition ou côtières. Cette directive établit un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau sur l'ensemble du territoire européen. Cette directive vise à :

- atteindre un bon état des eaux en 2015 :
 - (i) non détérioration des milieux,

(ii) effort sur les substances dites prioritaires (tableau 2),

(iii) mise en place de zones protégées ;

- réduire progressivement les rejets, les émissions ou pertes pour les substances prioritaires (2013/39/UE),
- supprimer les rejets des substances prioritaires dangereuses d'ici à 2021 (2006/11/CE).

La DCE prévoit aujourd'hui, pour l'ensemble de la gestion de l'eau sur le territoire européen, la mise en place de plans d'action articulés autour de la notion de bon état du milieu aquatique. Elle demande notamment de développer des indicateurs permettant d'évaluer la qualité physico-chimique des masses d'eau de transition en estuaire de Seine et les effets sur les organismes de l'écosystème.

2. Contexte écologique : l'estuaire de Seine

L'estuaire de Seine, d'une longueur de 776 km, draine un bassin versant de 79 000 km² représentant 14% de la superficie nationale et débouche sur la Manche. La Seine possède un régime macrotidal (*i.e* amplitude de marée proche de 8 mètres).

Selon la définition de Fairbridge (1980) l'estuaire de Seine se décompose en trois secteurs :

- le bas estuaire (de la baie de Seine à Honfleur),
- l'estuaire moyen (de Honfleur à Vieux-Port),
- et le haut estuaire (de Vieux-Port à Poses).

Sur cete base, Guezennec et al (1999) ont cartographié l'estuaire de Seine en distinguant trois zones (figure 1) :

- l'estuaire marin,
- l'estuaire moyen (sous l'influence de la marée saline),
- et l'estuaire fluvial (sous l'influence de la marée dynamique).

Tableau 2 : Annexe X de la directive n° 2013/39/UE du 12/08/13 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau.

Numéro	Numéro CAS (1)	Numéro UE (2)	Nom de la substance prioritaire (3)	Identifiée comme substance dangereuse prioritaire
(1)	15972-60-8	240-110-8	Alachlore	
(2)	120-12-7	204-371-1	Anthracène	X
(3)	1912-24-9	217-617-8	Atrazine	
(4)	71-43-2	200-753-7	Benzène	
(5)	sans objet	sans objet	Diphényléthers bromés	X (4)
(6)	7440-43-9	231-152-8	Cadmium et ses composés	X
(7)	85535-84-8	287-476-5	Chloroalcanes, C ₁₀₋₁₃	X
(8)	470-90-6	207-432-0	Chlorfenvinphos	
(9)	2921-88-2	220-864-4	Chlorpyrifos (éthylchlorpyrifos)	
(10)	107-06-2	203-458-1	1,2-dichloroéthane	
(11)	75-09-2	200-838-9	Dichlorométhane	
(12)	117-81-7	204-211-0	Di(2-ethylhexyle)phthalate (DEHP)	X
(13)	330-54-1	206-354-4	Diuron	
(14)	115-29-7	204-079-4	Endosulfan	X
(15)	206-44-0	205-912-4	Fluoranthène	
(16)	118-74-1	204-273-9	Hexachlorobenzène	X
(17)	87-68-3	201-765-5	Hexachlorobutadiène	X
(18)	608-73-1	210-168-9	Hexachlorocyclohexane	X
(19)	34123-59-6	251-835-4	Isoproturon	
(20)	7439-92-1	231-100-4	Plomb et ses composés	
(21)	7439-97-6	231-106-7	Mercure et ses composés	X
(22)	91-20-3	202-049-5	Naphtalène	
(23)	7440-02-0	231-111-4	Nickel et ses composés	
(24)	sans objet	sans objet	Nonylphénols	X (5)
(25)	sans objet	sans objet	Octylphénols (6)	
(26)	608-93-5	210-172-0	Pentachlorobenzène	X
(27)	87-86-5	201-778-6	Pentachlorophénol	
(28)	sans objet	sans objet	Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (7)	X
(29)	122-34-9	204-535-2	Simazine	
(30)	sans objet	sans objet	Composés du tributylétain	X (8)

Numéro	Numéro CAS (1)	Numéro UE (2)	Nom de la substance prioritaire (3)	Identifiée comme substance dangereuse prioritaire
(31)	12002-48-1	234-413-4	Trichlorobenzène	
(32)	67-66-3	200-663-8	Trichlorométhane (chloroforme)	
(33)	1582-09-8	216-428-8	Trifluraline	X
(34)	115-32-2	204-082-0	Dicofol	X
(35)	1763-23-1	217-179-8	Acide perfluorooctanesulfonique et ses dérivés (perfluoro-octanesulfonate PFOS)	X
(36)	124495-18-7	sans objet	Quinoxylène	X
(37)	sans objet	sans objet	Dioxines et composés de type dioxine	X (9)
(38)	74070-46-5	277-704-1	Aclonifène	
(39)	42576-02-3	255-894-7	Bifénox	
(40)	28159-98-0	248-872-3	Cybutryne	
(41)	52315-07-8	257-842-9	Cyperméthrine (10)	
(42)	62-73-7	200-547-7	Dichlorvos	
(43)	sans objet	sans objet	Hexabromocyclododécane (HBCDD)	X (11)
(44)	76-44-8/1024-57-3	200-962-3/ 213-831-0	Heptachlore et époxyde d'heptachlore	X
(45)	886-50-0	212-950-5	Terbutryne	

(1) CAS: Chemical Abstracts Service.

(2) Numéro UE: Inventaire européen des produits chimiques commercialisés (EINECS) ou Liste européenne des substances chimiques notifiées (ELINCS).

(3) Lorsque des groupes de substances ont été sélectionnés, sauf indication expresse, des représentants typiques de ce groupe sont définis aux fins de l'établissement des normes de qualité environnementale.

(4) Uniquement le tétrabromodiphényléther (n° CAS 40088-47-9), le pentabromodiphényléther (n° CAS 32534-81-9), l'hexabromodiphényléther (n° CAS 36483-60-0) et l'heptabromodiphényléther (n° CAS: 68928-80-3).

(5) Nonylphénol (n° CAS 25154-52-3; n° UE 246-672-0), y compris les isomères 4-nonylphénol (n° CAS 104-40-5; n° UE 203-199-4) et 4-nonylphénol (ramifié) (n° CAS 84852-15-3; n° UE 284-325-5).

(6) Octylphénol (n° CAS 1806-26-4; n° UE 217-302-5), y compris l'isomère 4-(1,1',3,3'- tétraméthylbutyl)-phénol (n° CAS 140-66-9; n° UE 205-426-2).

(7) Y compris le benzo(a)pyrène (n° CAS 50-32-8; n° UE 200-028-5), le benzo(b)fluoranthène (n° CAS 205-99-2; n° UE 205-911-9), le benzo(g,h,i)perylène (n° CAS 191-24-2; n° UE 205-883-8), le benzo(k)fluoranthène (n° CAS 207-08-9; n° UE 205-916-6) et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène (n° CAS 193-39-5; n° UE 205-893-2), mais à l'exception de l'anthracène, du fluoranthène et du naphthalène, qui sont énumérés séparément.

(8) Y compris le tributylétain-cation (n° CAS: 36643-28-4).

(9) Se rapporte aux composés suivants:

sept dibenzo-p-dioxines polychlorées (PCDD): 2,3,7,8-T4CDD (n° CAS 1746-01-6), 1,2,3,7,8-P5CDD (n° CAS 40321-76-4), 1,2,3,4,7,8-H6CDD (n° CAS 39227-28-6), 1,2,3,6,7,8-H6CDD (n° CAS 57653-85-7), 1,2,3,7,8,9-H6CDD (n° CAS 19408-74-3), 1,2,3,4,6,7,8-H7CDD (n° CAS 35822-46-9), 1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDD (n° CAS 3268-87-9);

dix dibenzofurannes polychlorés (PCDF): 2,3,7,8-T4CDF (CAS 51207-31-9), 1,2,3,7,8-P5CDF (CAS 57117-41-6), 2,3,4,7,8-P5CDF (CAS 57117-31-4), 1,2,3,4,7,8-H6CDF (CAS 70648-26-9), 1,2,3,6,7,8-H6CDF (CAS 57117-44-9), 1,2,3,7,8,9-H6CDF (CAS 72918-21-9), 2,3,4,6,7,8-H6CDF (CAS 60851-34-5), 1,2,3,4,6,7,8-H7CDF (CAS 67562-39-4), 1,2,3,4,7,8,9-H7CDF (CAS 55673-89-7), 1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDF (CAS 39001-02-0)

douze biphényles polychlorés de type dioxine (PCB-TD): 3,3',4,4'-T4CB (PCB 77, n° CAS 32598-13-3), 3,3',4',5-T4CB (PCB 81, n° CAS 70362-50-4), 2,3,3',4,4'-P5CB (PCB 105, n° CAS 32598-14-4), 2,3,4,4',5-P5CB (PCB 114, n° CAS 74472-37-0), 2,3',4,4',5-P5CB (PCB 118, n° CAS 31508-00-6), 2,3',4,4',5'-P5CB (PCB 123, n° CAS 65510-44-3), 3,3',4,4',5-P5CB (PCB 126, n° CAS 57465-28-8), 2,3,3',4,4',5-H6CB (PCB 156, n° CAS 38380-08-4), 2,3,3',4,4',5'-H6CB (PCB 157, n° CAS 69782-90-7), 2,3',4,4',5,5'-H6CB (PCB 167, n° CAS 52663-72-6), 3,3',4,4',5,5'-H6CB (PCB 169, n° CAS 32774-16-6), 2,3,3',4,4',5,5'-H7CB (PCB 189, n° CAS 39635-31-9).

(10) Le n° CAS 52315-07-8 se rapporte à un mélange d'isomères de cyperméthrine, d'alpha-cyperméthrine (n° CAS 67375-30-8), de bêta-cyperméthrine (n° CAS 65731-84-2), de thêta-cyperméthrine (n° CAS 71697-59-1) et de zêta-cyperméthrine (n° CAS 52315-07-8).

(11) Se rapporte au 1,3,5,7,9,11-hexabromocyclododécane (n° CAS: 25637-99-4), le 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododécane (n° CAS 3194-55-6), l'alpha-hexabromocyclododécane (n° CAS: 134237-50-6), le bêta-hexabromocyclododécane (n° CAS 134237-51-7) et le gamma-hexabromocyclododécane (n° CAS 134237-52-8).

Plus récemment, Mouny et Dauvin (2002) ont enrichis cette carte en qualifiant ces trois secteurs de l'estuaire de Seine en fonction de la salinité :

- la zone haline (salinité supérieure à 18),
- la zone mésohaline (salinité comprise entre 5 et 18),
- et la zone oligohaline (salinité inférieure à 5).

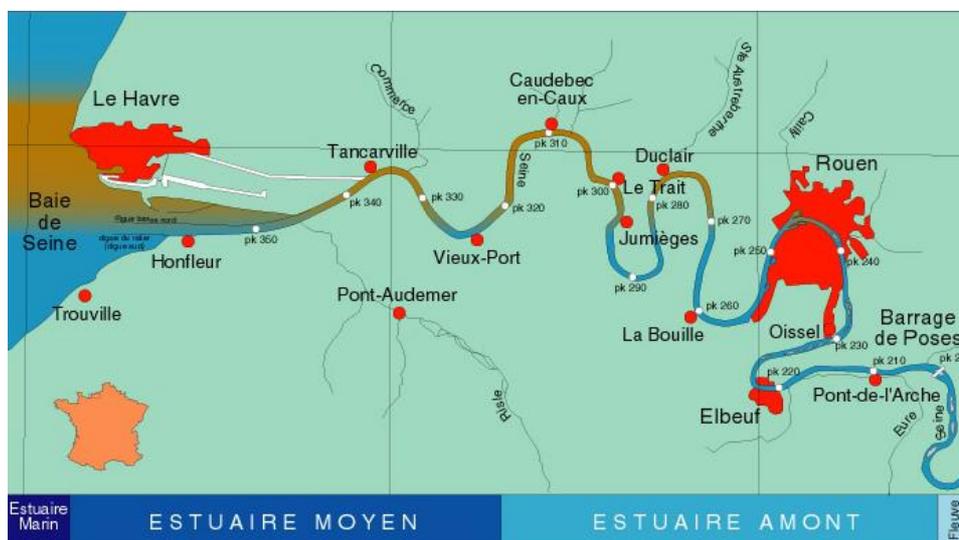


Figure 1 : L'estuaire de Seine (Guezennec, 2009).

L'estuaire de Seine est un site d'une grande richesse écologique (Fisson et al, 2014). En effet, il est le deuxième site ornithologique français : 80 à 120 000 oiseaux migrateurs arpentent la Seine tout au long de l'année. De plus, 60 espèces de poissons et 63 espèces de mammifères y sont recensées. Vingt pourcent de la flore de Haute-Normandie y est représentée dont 25% d'espèces très rares (données LPO www.LPO.fr). Mais le bassin versant de l'estuaire de Seine est également soumis à une forte pression anthropique. En effet, il supporte 40% de l'activité économique, 30% de l'activité agricole et 50% du trafic fluvial national, avec 2 ports d'importance majeure *i.e.* le Havre et Rouen ainsi que 4 zones industrielles situées à Elbeuf, Port Jérôme, Rouen et le Havre. L'estuaire de Seine concentre environ 16 millions d'habitants, dont 10 millions d'habitants dans la métropole parisienne, 400 000 habitants dans l'agglomération rouennaise et 250 000 habitants dans l'agglomération havraise.

Cette anthropisation a pour conséquence une contamination chimique de l'estuaire de Seine.

3. Contaminants organiques et biologiques étudiés

3.1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

3.1.1. Structure chimique et propriétés physico-chimiques

Les HAPs sont des hydrocarbures formés de cycles benzéniques condensés sous forme linéaire ou angulaire. Deux catégories de HAPs ont été différenciées à savoir les HAPs lourds et les HAPs légers, se distinguant essentiellement par le nombre de cycles qui les composent. Ces différences ont un impact conséquent sur les propriétés physico-chimiques et toxicologiques des HAPs. Cependant, de manière générale, les HAPs sont des composés non polaires, hydrophobes et donc peu solubles. En raison de leur faible hydrosolubilité et de leur hydrophobie, les HAPs tendent à s'adsorber aux particules solides des milieux aquatiques (Neff, 1979 ; CNRC, 1983 ; Eisler, 1987 ; Sloof et al, 1989). Le degré d'association des HAPs aux phases solides est fonction de la masse moléculaire et du coefficient de partage octanol/eau de chaque composé. Les HAPs peuvent également être localisés dans la colonne d'eau sous forme associée aux matières organiques (Sloof et al, 1989). Par ailleurs, la dégradation des HAPs - principalement par voie microbienne - est lente, d'autant plus s'ils sont composés d'un nombre important de cycles (Haritash & Kaushik, 2009). Ce sont donc des composés rémanents dans l'environnement et qualifiés de Polluants Organiques Persistants (POPs). Les HAPs sont des composés biodisponibles pour les êtres vivants. Ce risque de bioconcentration, important chez les organismes aquatiques (phytoplanctons, zooplanctons, bivalves et gastéropodes), est moindre chez les vertébrés (poissons, mammifères) du fait de la dégradation des HAPs par le système enzymatique des mono-oxygénases à cytochrome P450 lors des différentes phases de métabolisation. La toxicité des HAPs est depuis longtemps reconnue et ces substances sont même classées Cancérogènes, Mutagènes et Reprotoxiques (CMR). Ces substances figurent sur les listes prioritaires de la Commission européenne (DCE, tableau 2), de l'Agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (US EPA ; 16 HAPs, tableau 3) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS ; 9 HAPs, tableau 4). En ce qui concerne les eaux destinées à la consommation humaine, le décret n° 2001-1220 du 20 décembre 2001 (à l'exception des eaux minérales naturelles) indique que la somme des concentrations en benzo(b)fluoranthène (BbF), benzo(k)fluoranthène (BkF), benzo(a)pyrène (BaP), benzo(ghi)pérylène (BghiP) et indénopyrène (IcdP) ne doit pas excéder 0,1 µg.L⁻¹. De plus, la concentration en benzo(a)pyrène ne doit pas dépasser la valeur de 0,01 µg.L⁻¹. Pour l'OMS, le seuil limite en fluoranthène dans les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH) est fixé à 5 µg.L⁻¹, et à 0,7 µg.L⁻¹ pour le benzo(a)pyrène. En France, dans le cadre de la mise en place des Seuils d'Evaluation de la Qualité physicochimique des eaux (SEQ-eau), les concentrations en

HAPs (parmi d'autres contaminants) sont prises en compte pour le classement des cours d'eau suivant leur capacité à maintenir un équilibre biologique. Pour les milieux de très bonne qualité, les concentrations en HAPs de plus de 3 cycles doivent être inférieures à 25 ng.L⁻¹ et inférieures à 0,03 ng.L⁻¹ pour le BaP (Agence de l'eau, 1999). De plus, en terme d'évaluation des risques environnementaux dus aux HAPs, deux seuils sont fixés pour les sédiments marins et estuariens (pour la somme des HAPs définie selon Long et al, 1995), un ERL (Effect Range Low) et un ERM (Effect Range Median) respectivement de 4022 ng.g⁻¹ et de 44 792 ng.g⁻¹ de masse sèche.

Tableau 3 : Les 16 HAPs classés prioritaires par l'US EPA.

Nom	Nombre de cycle	Abbréviation	N° CAS	Formule chimique	Molécule
Naphtalène	2	Nap	91-20-3	C ₁₀ H ₈	
Acénaphthylène	3	ACY	208-96-8	C ₁₂ H ₈	
Acénaphtène		ACE	83-32-9	C ₁₂ H ₁₀	
Fluorène		Flu	86-76-7	C ₁₃ H ₁₀	
Anthracène		Anthr	120-12-7	C ₁₄ H ₁₀	
Phénanthrène		Phe	85-05-8	C ₁₄ H ₁₀	
Fluoranthène	4	Fla	206-44-0	C ₁₆ H ₁₀	
Pyrène		Pyr	129-00-0	C ₁₆ H ₁₀	
Benzo(a)anthracène		BaA	56-55-3	C ₁₈ H ₁₂	
Chrysène		Chry	218-01-9	C ₁₈ H ₁₂	
Benzo(a)pyrène	5	BaP	52-32-08	C ₂₀ H ₁₂	
Benzo(b)fluoranthène		BbF	205-99-2	C ₂₀ H ₁₂	
Dibenzo(ah)anthracène		DBahA	53-70-3	C ₂₂ H ₁₄	
Benzo(k)fluoranthène	6	BbK	207-08-9	C ₂₀ H ₁₂	
Benzo(ghi)pérylène		BghiP	191-24-2	C ₂₀ H ₁₂	
Indeno(1,2,3-cd)pyrène		IcdP	193-39-5	C ₂₂ H ₁₂	

3.1.2. Sources de pollution et dispersion dans l'environnement

Les HAPs sont issus de trois sources distinctes *i.e.* stationnaires industrielles, domestiques et mobiles (tableau 5), et ont trois origines :

- pyrolytique, la plus importante, combustion incomplète de matériel organique par les industries, transports, incinérateurs, incendies (Neff, 1979 ; McElroy et al, 1989),
- pétrogénique, issus de produits pétroliers et dérivés,

- et diagénique, la moins importante, formation naturelle du pétrole (Neff, 1979 ; McElroy et al, 1989).

Tableau 4 : Les 9 HAPs classés comme dangereux pour la santé humaine par l'OMS.

substance	abréviation	N° CAS	Code SANDRE	molécule	Origine majoritaire
Acénaphthène	ACE	83-32-9	1453		pétrogénique
Anthracène	ANT	120-12-7	1458		pétrogénique
Benzo(a)pyrène	BaP	50-32-8	1115		pyrolytique
Benzo(b)fluoranthène	BbF	205-99-2	1116		pyrolytique
Benzo(g,h,i)pérylène	BghiP	191-24-2	1118		pyrolytique
Benzo(k)fluoranthène	BkF	207-08-9	1117		pyrolytique
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	IcdP	193-39-5	1204		pyrolytique
Fluoranthène	FLU	206-44-0	1191		mixte
Naphtalène	NAPH	91-20-3	1517		pétrogénique

Tableau 5 : les différentes sources des HAPs.

Sources stationnaires industrielles	Sources domestiques	Sources mobiles
	Chauffage (gaz naturel, GPL, bois, charbon)	Voitures
Production d'aluminium	Tabagisme	Avions
Fabrication de pneu	Cuisson des aliments	Trains
Créosotes et préservation du bois		Bateaux
Sidérurgie		
Industrie du bitume et du goudrons		
Cimenteries		
Moteur à combustion		
Industries pétrochimiques et similaires		
Chauffage et électricité		
Incinérateurs de déchets ménagers et industriels		

Les apports de HAPs en estuaire de Seine proviennent essentiellement de l'amont, même si les apports internes ne sont pas pour autant à négliger. En effet, les ruissellements urbains transportent dans la Seine les HAPs issus des retombées atmosphériques émises par le chauffage domestique et le trafic automobile. La surveillance en estuaire de Seine se concentre sur deux compartiments pertinents à savoir le sédiment et le biotope. Les plus fortes concentrations en HAPs ont été mesurées à Poses et à Oissel, le HAP majoritairement retrouvé dans les matières en suspension (MES) étant le fluoranthène (32 % ; Lachambre & Fisson, 2007a ; figure 2).

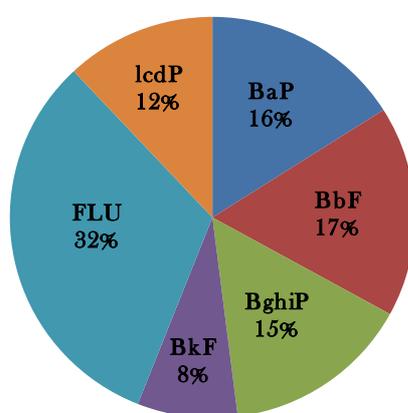


Figure 2 : Distribution moyenne des HAPs dans les matières organiques en suspension (MES) à Poses en 2005 (Lachambre & Fisson, 2007a).

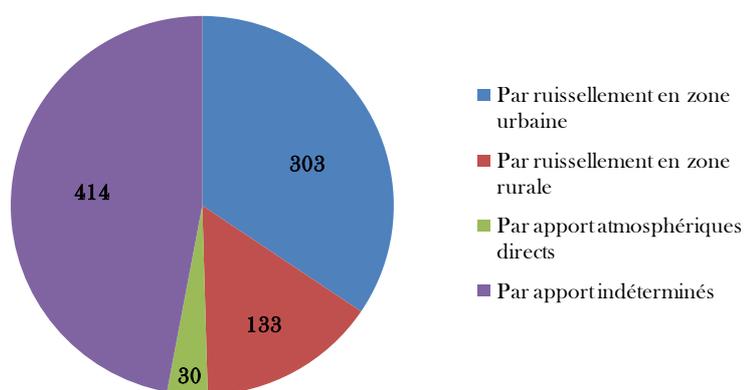


Figure 3 : Origine de la contamination en HAPs (14 molécules) dans l'estuaire de Seine en 2003

(GIP Seine Aval, 2004).

La baie de Seine est la plus contaminée du littoral français par les HAPs, selon le Réseau National d'Observation (RNO, 2006). Un flux annuel de HAPs au niveau du barrage de Poses (apport amont à l'estuaire) de 880 kg.an⁻¹ est à l'origine de cette contamination. A l'embouchure de l'estuaire, dans la zone du bouchon vaseux, zone de turbidité maximale où se concentrent les particules fines et les contaminants associés en période d'étiage, les concentrations en HAPs oscillent entre 0,15 et 0,4 µg.L⁻¹, sans que la source de contamination soit toutefois identifiée (figure 3).

3.1.3. Contamination des organismes vivants et des réseaux trophiques

L'accumulation de composés hydrophobes tels que les HAPs varie selon leur coefficient de partage octanol/eau et leur masse moléculaire. L'accumulation des HAPs est également gouvernée par la position des organismes dans la colonne d'eau. Les organismes au contact du sédiment ont tendance à accumuler des HAPs de masse moléculaire élevée. Les processus de biotransformation jouent également un rôle primordial dans l'accumulation de ces composés. Il apparaît notamment que les moules accumulent des composés de haute masse moléculaire contrairement aux poissons qui possèdent des capacités de biotransformation bien supérieures. Enfin, la position des espèces dans la chaîne trophique joue également un rôle non négligeable. En effet, des études ont démontré que le crabe accumule des HAPs de masses molaires plus faibles que les mysides ou encore les euphausiides (Baumard et al, 1998).

3.1.4. Effets toxiques chez les organismes aquatiques

La toxicité des HAPs en milieu aquatique dépend de leur biodisponibilité et de leur facteur de bioaccumulation ou de bioconcentration au sein des organismes. Les effets biologiques des HAPs peuvent également varier selon l'isomère considéré.

Toxicité aiguë

La toxicité aiguë des HAPs est principalement due à leur effet narcotique. Les HAPs sont parmi les contaminants les plus toxiques dans l'environnement aquatique, notamment par leurs propriétés mutagènes et carcinogènes (Shaw & Connell, 1994). Des CL₅₀ ont été enregistrées chez plusieurs espèces de vertébrés et d'invertébrés pour différents composés et figurent dans le tableau

6. Des CL_{50} , 48 heures ont été obtenues pour différentes espèces exposées à des HAPs comprenant entre 2 et 5 cycles aromatiques. Chez les vertébrés, des CL_{50} de 0,241 et 0,071 $mg.L^{-1}$ ont été enregistrées chez le poisson de lait *Chanos chanos* lors d'exposition respectivement à l'anthracène et au benzo(a)pyrène (Palanikumar et al, 2012). Chez les invertébrés, des CL_{50} , 48 heures ont été obtenues chez les Daphnies, *Daphnia magna* et *Daphnia pulex*. Dans le cadre d'exposition de *Daphnia magna* à l'acénaphène, une CL_{50} , 48 heures de 41000 $\mu g.L^{-1}$ a été enregistrée (Leblanc, 1980). Des CL_{50} , 48 heures de 4100, 2160, 3400 et 4663 $\mu g.L^{-1}$ ont été également obtenues lors d'exposition de *Daphnia pulex* au naphthalène (Crider et al, 1983 ; Milleman et al, 1984 ; Geiger & Buikema, 1981 ; Smith et al, 1988). En parallèle, une CL_{50} , 48 heures de 10 $\mu g.L^{-1}$ a été observée dans le cadre d'une exposition de *Daphnia pulex* au naphthalène (Trucco et al, 1983). Enfin, des expérimentations ont également portées sur les copépodes. Notamment, des CL_{50} , 48 heures de 0,422 et 0,89 $mg.L^{-1}$ ont été obtenues respectivement pour *Acartia tonsa* et *Robertsiona propinqua* lors d'exposition au phénanthrène (Bellas & Thor, 2007 ; Stringer et al, 2012) et à 25,3 $\mu g.L^{-1}$ pour *Eurytemora affinis* lors d'une exposition au B(a)P (Forget-Leray et al, 2013).

Toxicité chronique

La toxicité chronique dépend essentiellement de la structure du composé et de sa métabolisation. Deux voies de métabolisation des HAPs ont été mises en évidence chez les vertébrés *i.e.* la mono-oxygénation et l'oxydation mono-électronique via des mono-oxygénases à cytochrome P450. Les capacités de biotransformation des HAPs par les invertébrés sont, quant à elles, très variables d'un taxon à l'autre, et d'une espèce à l'autre, de faibles pour les mollusques à élevées pour certains crustacés (Jorgensen, 2010). Le potentiel immunotoxique et génotoxique (via la formation d'adduits à l'ADN) des HAPs a été identifié à la fois chez les poissons et chez les mollusques (Reynaud & Deschaux, 2006 ; Wootton et al, 2003). Les HAPs sont également connus pour induire des effets sur la reproduction, notamment, démontré chez les poissons comme le choquemort *Fundulus heteroclitus* (Wassenberg et al, 2002). De nombreux effets sub-létaux des HAPs sur divers organismes ont été mis en évidence. Chez les poissons, notamment chez la perche de mer *Sebastes Schlegeli* (Hilgendorf) et le bar *Lateolabrax japonicus*, le BaP induit un effet sur la durée de développement (Jifa et al, 2006 ; Kim et al, 2008).

Tableau 6 : CL50 relevées dans la littérature chez différents organismes aquatiques lors d'exposition aux HAPs. (a 24 h, b 48 h, c 72 h, d 96 h).

Nom Commun	Espèce	CL ₅₀ (mg.L ⁻¹)	HAPs	Références
<i>Vertébrés</i>				
Poisson lait	<i>Chanos chanos</i>	0,633 ^a	Anthracène	Palanikumar et al, 2012
		0,088 ^a	Benzo(a)pyrène	Palanikumar et al, 2012
		0,241 ^b	Anthracène	Palanikumar et al, 2012
		0,071 ^b	Benzo(a)pyrène	Palanikumar et al, 2012
		0,031 ^d	Anthracène	Palanikumar et al, 2012
		0,014 ^d	Benzo(a)pyrène	Palanikumar et al, 2012
Truite	<i>Salmo trutta</i>	580 ^d (µg.L ⁻¹)	Acenaphène	Holcombe et al, 1983
Tête de boule	<i>Pimephales promelas</i>	1730 ^d (µg.L ⁻¹)	Acenaphène	Geiger et al, 1985
<i>Invertébrés</i>				
Copépodes (adultes)	<i>Acartia tonsa</i>	0,422 ^b	Phenanthrène	Bellas & Thor, 2007
	<i>Robersonia propinqua</i>	0,89 ^b	Phenanthrène	Stringer et al, 2012
	<i>Quinquelaophontes sp</i>	0,75 ^c	Phenanthrène	Stringer et al, 2012
	<i>Oithona clavisae</i>	0,522 ^b	Phenanthrène	Barata et al, 2005
	<i>Palaemonetes pugio</i>	0,36 ^c	Phenanthrène	Unger et al, 2007
	<i>Eurytemora affinis</i>	0,025 ^b	Benzo(a)pyrène	Forget-Leray et al, 2013
Copépodes (nauplii)	<i>Nitrocris lacustri</i>	71 ^d (µg.g ⁻¹)	Phenanthrène	Lotufo & Fleeger, 1997
	<i>Shizopera knabeni</i>	84 ^d (µg.g ⁻¹)	Phenanthrène	Lotufo & Fleeger, 1997
	<i>Eurytemora affinis</i>	0,045 ^d	Benzo(a)pyrène	Forget-Leray et al, 2005
Mysides	<i>Americamysis bahia</i>	545 ^b (µg.L ⁻¹)	Acenaphène	Thursby et al, 1989
Daphnie	<i>Daphnia magna</i>	41000 ^b (µg.L ⁻¹)	Acenaphène	Leblanc, 1980
		1000 ^d (µg.L ⁻¹)	Naphtalène	Trucco et al, 1983
	<i>Daphnia pulex</i>	10 ^b (µg.L ⁻¹)	Benzo(a)anthracène	Trucco et al, 1983
		4100 ^b (µg.L ⁻¹)	Naphtalène	Crider et al, 1983
		2160 ^b (µg.L ⁻¹)	Naphtalène	Milleman et al, 1984
		5 ^d (µg.L ⁻¹)	Benzo(a)pyrène	Trucco et al, 1983
		9 ^d (µg.L ⁻¹)	Benzo(a)pyrène	Kagan et al, 1985; 1987
		3400 ^b (µg.L ⁻¹)	Naphtalène	Geiger et Buikema, 1981
		4663 ^b (µg.L ⁻¹)	Naphtalène	Smith et al, 1988

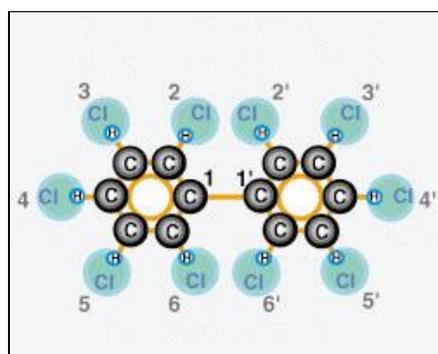
Chez les crustacés, les HAPs induisent des effets sur le temps de développement. L'exposition au BaP induit un retard de développement respectivement chez la crevette *Palaemonetes pugio*, et chez les copépodes *E. affinis* et *T. japonicus* (Oberdöster et al, 2000 ; Forget-leray et al, 2005 ; Bang et al, 2009). Un retard dans le développement est également observé chez le crabe américain *Rhithropanopeus harrisi* et la Daphnie *Daphnia pulex* après une exposition au phénanthrène (Laughlin & Neff, 1979 ; Geiger & Buikema 1992). Bellas & Thor (2007) et Lotufo & Fleeger (1997) ont montré également des effets sur la reproduction avec une diminution du nombre d'œufs produits par femelle chez le copépode *Acartia tonsa* à 1245 nM lors d'exposition au phénanthrène et chez les copépodes femelles *N. lacustri* et *S. knabeni* entre 22 et 90 µg.g⁻¹. Enfin, des effets sur le sex-ratio ont également été rapportés lors d'exposition de *T. japonicus* au BaP (Bang et al, 2009).

3.2. Polychlorobiphényles (PCBs)

3.2.1. Structure chimique et propriétés physico-chimiques

Les polychlorobiphényles (PCBs) aussi appelés biphényles polychlorés (BPCs) sont des composés classés selon leur teneur en chlore, liquides plus ou moins visqueux voire résineux, insolubles dans l'eau, incolores ou jaunâtres à forte odeur aromatique. Ils sont thermostables et ne se décomposent qu'à des températures dépassant 1000 °C. Leur grande inertie chimique les rend peu sensibles aux acides, bases et oxydants.

La famille des PCBs est composée de 209 molécules se différenciant essentiellement par la position d'atomes de chlore sur la molécule de biphényle. Ils sont désignés par le sigle PCB suivi d'un numéro correspondant à leur structure selon la nomenclature internationale IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Les composés aux numéros élevés correspondent à des molécules avec des degrés de chloration importants (figure 4). Sept PCBs sont recherchés dans le cadre de l'action nationale de Recherche et de Réduction des Rejets de Substances Dangereuses dans les Eaux (3RSDE) mise en œuvre par la Circulaire du 5 janvier 2009 relative à la 2^{ème} phase de l'action RSDE pour les ICPE (Installations Classées pour la Protection de l'Environnement) soumises à autorisation. Leur structure et leurs propriétés ont été représentées figure 4 et tableau 7 (Lachambre & Fisson, 2007b).



2, 2', 6, 6' : ortho-substitutions

3, 3', 5, 5' : méta-substitutions

4, 4' : para-substitutions

Figure 4 : Structure générale des PCBs.

Tableau 7 : Propriétés physico-chimiques des 7 PCBs les plus étudiés en estuaire de Seine (Lachambre & Fisson, 2007b). Les Koc et Kp sédiments ont été déterminés à partir de mesures réalisées sur l'estuaire de Seine (ATSDR, 2000 - PCB ; van Wezel, 1999 ; Munsch et al, 1996 ; Sander, 1999 ; Birnbaum, 1985 ; SRC).

Composés	masse moléculaire g.mol ⁻¹	Solubilité µg.L ⁻¹	Log Kow	Koc <i>in situ</i> l.Kg ⁻¹	Kp sédiments l.Kg ⁻¹
PCB 28	257.4	270	5,62-5,69	1,07.10 ⁶ -1,62.10 ⁶	52,5.10 ³ -72,4.10 ³
PCB 52	291.8	15,3-26,5	6.09	0,83.10 ⁶ -1,23.10 ⁶	49,0.10 ³ -66,1.10 ³
PCB 101	326.3	10-15,4	6,11-7,07	4,47.10 ⁶ -6,92.10 ⁶	0,21.10 ⁶ -0,31.10 ⁶
PCB 118	360.9	15	6,57-7,12	5,13.10 ⁶ -5,75.10 ⁶	0,27.10 ⁶ -0,49.10 ⁶
PCB 138	360.9	15.9	6,5-7,44	7,41.10 ⁶ -9,77.10 ⁶	0,45.10 ⁶
PCB 153	360.9	0,86-0,91	6,72-8,35	8,13.10 ⁶ -10,7.10 ⁶	0,40.10 ⁶ -0,43.10 ⁶
PCB 180	395.3	0,23-6,56	6,7-7,21	6,0.10 ⁶ -7,9.10 ⁶	

3.2.2. Sources de pollution et dispersion dans l'environnement

Les PCBs sont des composés de synthèse issus d'un procédé consistant, dans un premier temps, à produire un biphenyle par déshydrogénation de deux molécules de benzène à 800°C, puis à y substituer les atomes d'hydrogène par des atomes de chlore anhydre en présence d'un catalyseur, le chlorure ferrique (figure 5). Ils ont été utilisés à des fins industrielles :

- en systèmes clos :

- fluides diélectriques dans les transformateurs, les condensateurs et les sectionneurs de puissances ou comme isolants dans des environnements à très haute tension,
- fluides caloporteurs dans les environnements à risque d'incendie,
- fluides hydrauliques de sécurité dans des environnements à risque ou à contraintes thermiques,
- en systèmes dispersifs ou ouverts :
 - additifs lubrifiants haute pression et fluides industriels dans les huiles hydrauliques, huiles de coupe de métaux, fluides pour pompes à vide,
 - additifs ignifugeants dans les matières plastiques,
 - agents plastifiants et adhésifs pour les peintures, laques, vernis, colles, encres, fils, câbles, textiles synthétiques, joints d'isolation et mastics, revêtements de sol, produits en PVC, caoutchouc, papiers,
 - additif dans les insecticides, bactéricides, cires de fonderie, agents d'imperméabilisation, agents antioxydants.

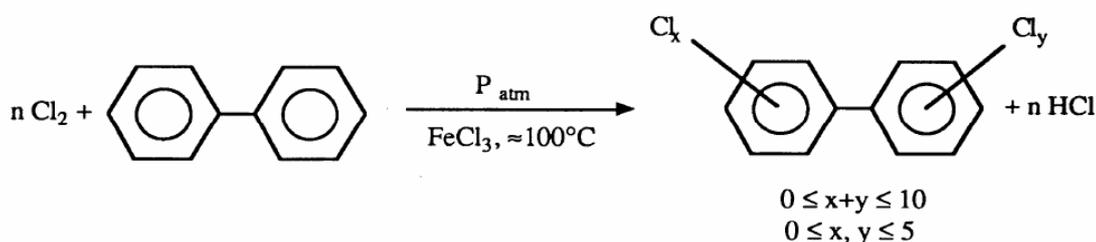


Figure 5 : Synthèse des PCBs.

Très largement utilisés dans les années 1930 à 1970, ils sont largement dispersés dans l'environnement. Ce sont des composés très hydrophobes s'adsorbant donc en majorité sur les sédiments (les plus solubles étant les composés les moins chlorés), très persistants et donc rémanents dans l'environnement. Ils sont solubles dans les solvants organiques et dans les huiles végétales. Ses caractéristiques en font un membre de la famille des POPs. De même que les HAPs, les PCBs figurent sur les listes des substances prioritaires de la Commission Européenne (DCE), de l'US-EPA et de l'OMS. Les 209 congénères de la famille des PCBs sont classés en 2 catégories :

- les PCBs Dioxin-Like (PCB-DL, structure coplanaire)
- les PCBs Non Dioxin-Like (PCB-NDL, structure globulaire)

La notion de PCB-DL est apparue au cours de l'année 1993, lorsque la toxicité de 14 PCBs (notamment les PCBs 170 et 180) a été apparentée à celle des dioxines. Ce n'est qu'en 1997 que l'OMS a réduit cette liste à 12 composés *i.e.* PCB 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 et 189). Les PCBs-NDL ont un mécanisme de toxicité bien différent des PCBs-DL. Ces PCBs, très chlorés, sont peu métabolisables et sont très abondants dans les mélanges industriels contrairement aux PCBs-DL. Parmi les PCBs-DL ou PCBs-NDL, 7 composés (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) ont été identifiés comme PCBs indicateurs (PCBi) ; ils sont considérés prioritaires (figure 6). Ils ont été sélectionnés pour leur caractère particulièrement rémanent et leur abondance dans l'environnement. Ces PCBs représenteraient à eux seuls près de 50% de la totalité des congénères quantifiés dans les matrices biologiques (EFSA, 2005).

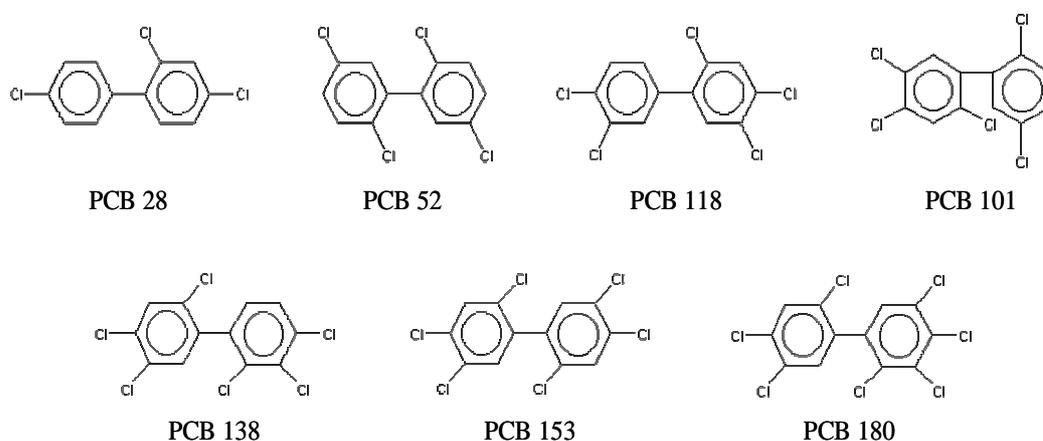


Figure 6 : Liste des 7 PCBs prioritaires définie par le BCR-CEE (Bureau Communautaire de Référence).

En terme d'évaluation du risque environnemental causé par les PCBs, aucune valeur de PNEC (Predicted No Effect Concentration), plus forte concentration de la substance sans risque pour l'environnement, n'est préconisée, aussi bien au niveau national (INERIS, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques) qu'au niveau européen (Environmental Protection Agency, Union Européenne) et international. Toutefois, une échelle des risques a été développée pour les PCBs et les HAPs adsorbés sur les sédiments marins et estuariens (Long et al, 1995). Cette échelle fixe deux seuils pour chaque congénère de PCB (pour la somme des PCBs définie selon Long et al (1995), un ERL (Effect Range-Low) et un ERM (Effect Range-Median). Pour des concentrations inférieures aux ERL, aucun effet biologique n'est observé; au-delà des ERM, des effets biologiques sont fortement probables ; entre ces deux seuils, des effets peuvent occasionnellement être observés. Les ERL et ERM définis pour la somme des PCBs sont

respectivement de 22,7 ng.g⁻¹ et de 180 ng.g⁻¹ de masse sèche.

Les PCBs ont été très largement recensés en estuaire de Seine. Des concentrations de 2,6 à 4,8 ng.L⁻¹ dans l'eau et 11,8 à 134 ng.g⁻¹ de masse sèche (MS) dans le sédiment ont été relevées selon le site de prélèvement (Teil et al, 2014). Leur présence dans le compartiment aquatique est due essentiellement au relargage à partir des sédiments (contaminants piégés datant de plusieurs années). Au niveau du barrage de Poses, les teneurs en PCB_i fluctuent entre 50 et plus de 1000 µg.kg⁻¹ MS depuis les années 1990. A Oissel, de très fortes concentrations en PCBs - supérieures à 100 000 µg.kg⁻¹ MS - dans les sédiments ont été enregistrées notamment en 1991, 1997 et 2003. Enfin, des teneurs de l'ordre de quelques dizaines à une centaine de µg.kg⁻¹ MS ont été recensées à Caudebec-en-Caux, la Bouille et Honfleur. Des flux annuels des 7 PCBs ont été mesurés au niveau du barrage de Poses entre 1999 et 2004 (Lachambre & Fisson, 2007b ; tableau 8) avec un pic de contamination dans les sédiments de Oissel par rapport à la Bouille et à Poses (figure 7) qui s'élevait à plus de 154 000 µg.kg⁻¹ MS en 2003 (figure 8).

Tableau 8 : Flux annuels des 7 PCB_i en estuaire de Seine à Poses entre 1999 et 2004 (Lachambre & Fisson, 2007b).

Flux(Kg.an ⁻¹)	1999	2000	2001	2002	2003	2004
PCB 28	5,7-20	4,7-23	1,3-27	1,3-19	2,2-13	11
PCB 52	18-25	18-29	1,3-27	14-26	9,2-18	29
PCB 101	22-34	12-27	8-28	1,3-19	4,1-14	6,5
PCB 118	9,4-23	10-24	5,8-27	2,4-19	5,4-15	5,9
PCB 138	35-43	16-27	15-30	2,8-19	2,2-13	2,8
PCB 153	48-54	17-27	11-27	13-27	7,4-16	9,1
PCB 180	33-51	1,4-22	2,5-28	2,5-19	2,2-13	2,7

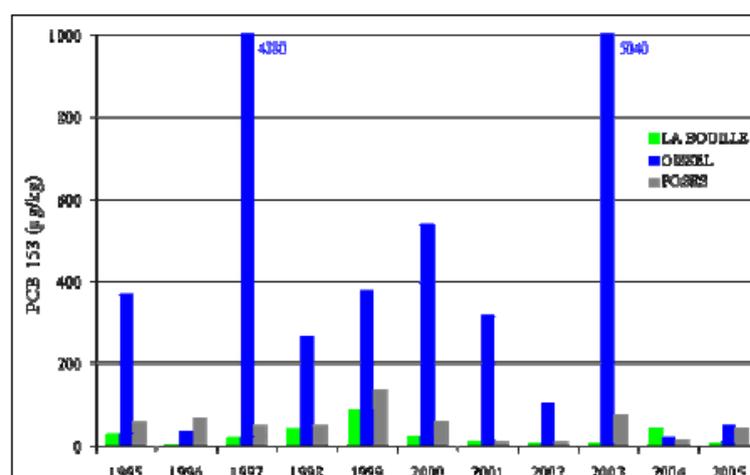


Figure 7 : Contamination en PCB 153 des sédiments de la Bouille, Oissel et Poses de 1995 à 2005 (Service de la Navigation de la Seine (SNS) ; Lachambre & Fisson, 2007b).

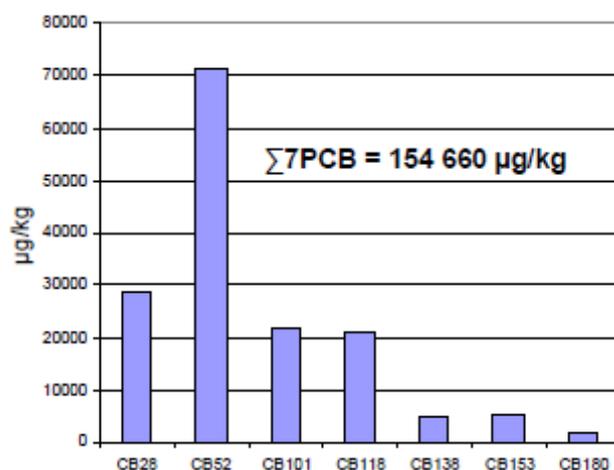


Figure 8 : Profil de contamination par les PCB des sédiments de Oissel en 2003 (année très contaminée). Ce profil est similaire à ceux des autres années de forte contamination (Service de la Navigation de la Seine (SNS) ; Lachambre & Fisson, 2007b).

3.2.3. Contamination des organismes vivants et réseaux trophiques

En raison de son abondance dans l'environnement, la majorité des études évaluant la contamination des réseaux trophiques par les PCB ciblent le PCB 153. En Seine, les niveaux de contamination des organismes en PCB 153 se révèlent très variables (tableau 9 ; Abarnou et al, 2000).

Tableau 9 : Concentrations de PCB153 ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ de masse sèche) chez différentes espèces de l'estuaire de Seine en 1996 et 1997 (Abarnou et al, 2000).

Espèces	Familles	Présence estuarienne	PCB 153 ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de poids sec)
Copépode (<i>E. affinis</i>)	Zooplancton	Aval	70-120
Crevette (<i>C. crangon</i>)	Crustacé	Aval et baie	160-180
Coque (<i>C. edule</i>)	Mollusque bivalve	Aval et baie	80-110
Dreissène	Mollusque bivalve	Amont et aval	120-190
Gardon	Poisson	Amont	40
Flet	Poisson	Amont, aval et baie	180-510
Bar	Poisson	Amont, aval et baie	180-320
Anguille	Poisson	Amont et aval	540-840

Les poissons, en fin de chaîne trophique, sont généralement les plus contaminés (tableau 10 ; Van Wezel et al, 1999 ; Lachambre & Fisson, 2007b). Par exemple, l'anguille (forte teneur

corporelle en lipide) peut bioaccumuler de fortes concentrations en PCBs de l'ordre de plusieurs milliers de $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MF (Masse Fraîche).

La brème est également très contaminée avec des valeurs de 100 et 2000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MF. Le bar, l'éperlan, le gardon, la perche, le sandre et la sole présentent des valeurs de quelques centaines de $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MF. Le saumon, poisson migrateur, présente des valeurs plus faibles de l'ordre de quelques dizaines de $\mu\text{g.kg}^{-1}$ MF (Abarnou et al, 2000 *in* Lachambre & Fisson, 2007b). Le dernier état des lieux de la contamination en PCBs en estuaire de Seine a mis en évidence des concentrations de 26,9 à 211 ng.g^{-1} MS chez le gardon *Rutilus rutilus* selon le site de prélèvement (Teil et al, 2014).

Tableau 10 : Facteur de bioaccumulation (FCB) de deux congénères (PCB 118 et PCB 153) chez différents organismes ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ de Masse Fraîche ; Van Wezel et al, 1999 *in* Lachambre & Fisson, 2007b).

Congénères	FCB crustacés	FCB bivalves	FCB poissons
PCB 118	$7.10^4 - 2,7.10^5$	ND	$5,9.10^4$
PCB 153	$1,3.10^4 - 4,4.10^5$	$4,2.10^4 - 5,6.10^5$	$2,2.10^4 - 10.10^6$

3.2.4. Effets toxiques chez les organismes aquatiques

Comme énoncé précédemment, la toxicité des PCBs dépend essentiellement du nombre et de la position des atomes de chlore disposés sur la molécule. La toxicité des PCBs-DL (coplanaires) s'avère plus importante que la toxicité des PCBs-NDL (globulaires).

Toxicité aiguë

Un grand nombre d'études pour évaluer la toxicité des PCBs sur les organismes aquatiques a été réalisé avec des mélanges commerciaux de PCBs Aroclor (Monsanto) dont les valeurs de CL_{50} sont recensées dans le tableau 11. Différents mélanges commerciaux peuvent être principalement caractérisés par leur degré de chloration. Lors de l'analyse qualitative des PCBs, il est généralement fait référence à la gamme de Monsanto pour les désigner. Cette gamme est composée des Aroclor 1221, 1232, 1016, 1242, 1248, 1254, 1260, 1262. Les deux derniers chiffres correspondent au pourcentage massique de chlore dans le mélange. Par exemple, 60 % de la masse de l'Aroclor 1260 est constituée de chlore ; Les deux premiers chiffres correspondent au nombre d'atomes de carbone présents dans la molécule. Ils sont toujours au nombre de 12 dans les PCBs.

L'Aroclor présente une toxicité aiguë pour les vertébrés. Pour les poissons d'eau douce, Stalling & Mayer (1972) ont rapporté une CL_{50} , 96 h de 0,28 et de 2,74 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectivement pour l'Aroclor 1248 et 1254 chez le crapet arlequin *Lepomis macrochirus*, et de 5,43 et de 5,75 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour l'Aroclor 1242 et 1248 chez le saumon *Salmo clarki*. Cette étude a également mis en évidence une corrélation positive entre le niveau de toxicité et le nombre de cycle du mélange d'Aroclor. La toxicité de l'Aroclor a également été identifiée chez les invertébrés (Tableau 11). Plusieurs études ont été menées chez les crustacés comme les gammarus et plus particulièrement *Gammarus pseudolimnaeus* et *fasciatus*. Dans ce cadre, des CL_{50} , 96h de 10 et 52 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ont été mesurées lors d'exposition de *Gammarus pseudolimnaeus* à respectivement l'Aroclor 1242 et 1248 (Eisler, 1986). Des CL_{50} similaires avaient été décrites antérieurement chez *Gammarus fasciatus* pour ces mêmes composés (Stalling & Mayer, 1972). Enfin, la toxicité de l'Aroclor 1242 a également été observée chez les crevettes, avec la détermination d'une CL_{50} , 96h à 13 $\mu\text{g.L}^{-1}$ chez *Crangon septemspinosa* (Eisler, 1986).

Peu d'études se sont attachées à décrire la toxicité aiguë des PCBs, autre que celle des composés appelé Aroclor. Pour le PCB 153 chez les crustacés, des CL_{50} de 1,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ont été rapportées chez *Daphnia magna* après une exposition de 48 h (Dillon & Burton, 1991) et de 0,59 mg.L^{-1} lors d'une exposition de 96h (Zou & Fingerman, 1997), alors que Nakari & Huhtala (2008) ont montré chez la même espèce que tous les organismes étaient morts après 3 jours d'exposition à 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de PCB 153. Pour le PCB 126, une étude portant sur le Medaka japonais, *Orizias latipes* a mis en évidence une CL_{50} , 48h de 0,25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Kim & Cooper, 1999). Chez les copépodes, une CL_{50} , 48 heures de 31,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a été obtenue pour *Eurytemora affinis* lors d'une exposition au PCB 126 (Forget-Leray et al, 2013).

Toxicité chronique

Chez les organismes aquatiques, les études concernant la toxicité chronique des PCBs sont de plus en plus nombreuses, focalisées le plus souvent sur les mélanges commerciaux Aroclor. Néanmoins Kim & Cooper (1999), Vicquelin et al (2011) ont notamment reporté des effets tératogènes du PCB 153 et 126 sur les embryons du Medaka japonais (*Oryzias latipes*).

Tableau 11 : CL50, 96h relevées dans la littérature chez différents organismes aquatiques lors d'exposition aux PCBs.

Nom Commun	Espèce	Composé	CL ₅₀ (µg.L ⁻¹)	durée	Références
<i>Vertébrés</i>					
Crapet arlequin	<i>Lepomis macrochirus</i>	Aroclor 1248	0.28	96 h	Stalling & Mayer, 1972
		Aroclor 1254	2.74	96 h	Stalling & Mayer, 1972
Saumon	<i>Salmo clarki</i>	Aroclor 1221	1.17	96 h	Stalling & Mayer, 1972
		Aroclor 1232	2.5	96 h	Stalling & Mayer, 1972
		Aroclor 1242	5.43	96 h	Stalling & Mayer, 1972
		Aroclor 1248	5.75	96 h	Stalling & Mayer, 1972
		Aroclor 1254	42.5	96 h	Stalling & Mayer, 1972
		Aroclor 1260	60.9	96 h	Stalling & Mayer, 1972
		Aroclor 1262	50	96 h	Stalling & Mayer, 1972
		Aroclor 1268	50	96 h	Stalling & Mayer, 1972
<i>Invertébrés</i>					
Gammare	<i>Gammarus pseudolimnaeus</i>	Aroclor 1242	10	96 h	Eisler, 1986
		Aroclor 1248	52	96 h	Eisler, 1986
	<i>Gammarus fasciatus</i>	Aroclor 1242	10	96 h	Stalling & Mayer, 1972
		Aroclor 1248	52	96 h	Stalling & Mayer, 1972
Crevette grise	<i>Crangon septemspinosa</i>	Aroclor 1254	2400	96 h	Stalling & Mayer, 1972
		Aroclor 1242	13	96 h	Eisler, 1986
		Aroclor 1260	10000	48h	Portmann & Wilson, 1971
	<i>Palaemonetes pugio</i>	Aroclor 1254	41	96 h	Roesijadi et al, 1976

De plus, les PCBs-DL sont reconnus aujourd'hui comme étant des perturbateurs endocriniens avérés chez les invertébrés, notamment chez *Daphnia Magna* via leurs effets sur la viabilité des œufs, le cycle de mue dès $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de PCB 29 (Zou, 2005 ; Zou & Fingerman, 1997), et sur la fertilité dès $10 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de PCB 153 ou de PCB 52 (Bernatowicz & Pijanowska, 2011).

3.3. Alkylphénols (APs)

3.3.1. Structure chimique et propriétés physico-chimiques

Les alkylphénols (APs) sont synthétisés à haute température par réaction entre un phénol et une molécule de tripropylène en présence d'un catalyseur (résines sulfoniques, BF_3 ... ; figure 9). Ils servent d'intermédiaire dans la synthèse d'agents tensioactifs et de résines phénoliques et entrent dans la fabrication de produits de nettoyage, de produits cosmétiques, de pesticides (co-formulants) et du papier (Becue & Ngyen, 2005).

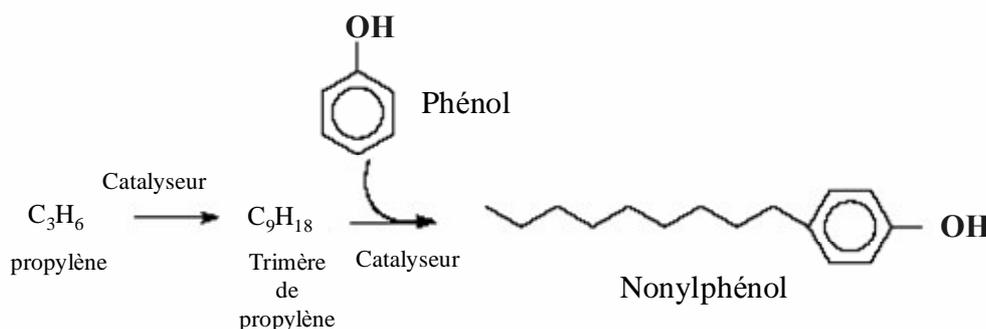


Figure 9 : Synthèse des alkylphénols (Cailleaud, 2006).

Les APs sont des tensio-actifs organiques non ioniques. Ce sont des molécules amphiphiles possédant au moins un groupe polaire et une chaîne carbonée apolaire. Les APs sont peu volatiles (pression de vapeur inférieure à 10 Pa) et peu solubles dans l'eau contrairement aux alkylphénols -éthoxylés (APEOs) qui eux sont très solubles (tableau 12).

Tableau 12 : Propriétés physico-chimiques de l'octylphénol et du nonylphénol et facteur de bioconcentration chez les organismes aquatiques (Becue & Nguyen, 2005 ; E.U., 2002 ; Johnson et al, 2000 in Lachambre & Fisson, 2007).

Substances	Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)	Solubilité (mg.L ⁻¹)	LogK _{ow}	K _{oc} (L.kg ⁻¹)	FCB	Biodégradation (demi-vie)
Octylphénols	206,33	12,6	4,12	2740-20000	Poissons : 634	Eau : 7 à 50 jours
Nonylphénols	220,34	5,43	4,2-4,48	5360-22400	Moules : 2000-3000 / Poissons : 741-1300	Eau : 150 jours / sédiments : 300 jours

3.2.2. Sources de pollution et dispersion dans l'environnement

La majorité des APs proviennent de la biodégradation des APEOs. En effet, les APEOs à chaînes longues sont rapidement (quelques jours) dégradés dans le milieu aquatique pour former des APEOs à chaînes courtes et des APs (figure 10). Ces produits de dégradation sont rémanents et toxiques pour les organismes.

Parmi les APs, les nonylphénols (NPs) - majoritairement détectés dans l'environnement - sont des APs possédant une chaîne ramifiée à 9 carbones. La production de NPs en Europe avoisinait les 73 500 tonnes en 1997 (EU, 2002). Actuellement, les NPs utilisés en France sont totalement importés. Les APs sont des composés présents dans l'ensemble des écosystèmes du fait de leur large utilisation (EU, 1999). Les APs retrouvés dans les écosystèmes proviennent soit de la dégradation des APEOs soit d'une libération directe à partir de produits commerciaux. Ces composés sont introduits dans l'environnement soit *via* les effluents de stations d'épuration (STEPS) urbaines ou industrielles soit *via* l'épandage direct de pesticides. Selon le TemaNord (1996), la répartition théorique des APs est la suivante :

- 60% dans les sédiments aquatiques
- 25% dans la colonne d'eau
- 15 % dans les sols

En estuaire de Seine, deux sources principales d'APs ont été identifiées par Budzinski et al (2006) (hormis les industries) *i.e.* les apports amont via Poses (source majeure) et les STEPs situées sur l'estuaire. Des analyses effectuées en 2004 n'ont pas enregistré de concentrations en APs supérieures à la limite de détection (0,1 µg.L⁻¹).

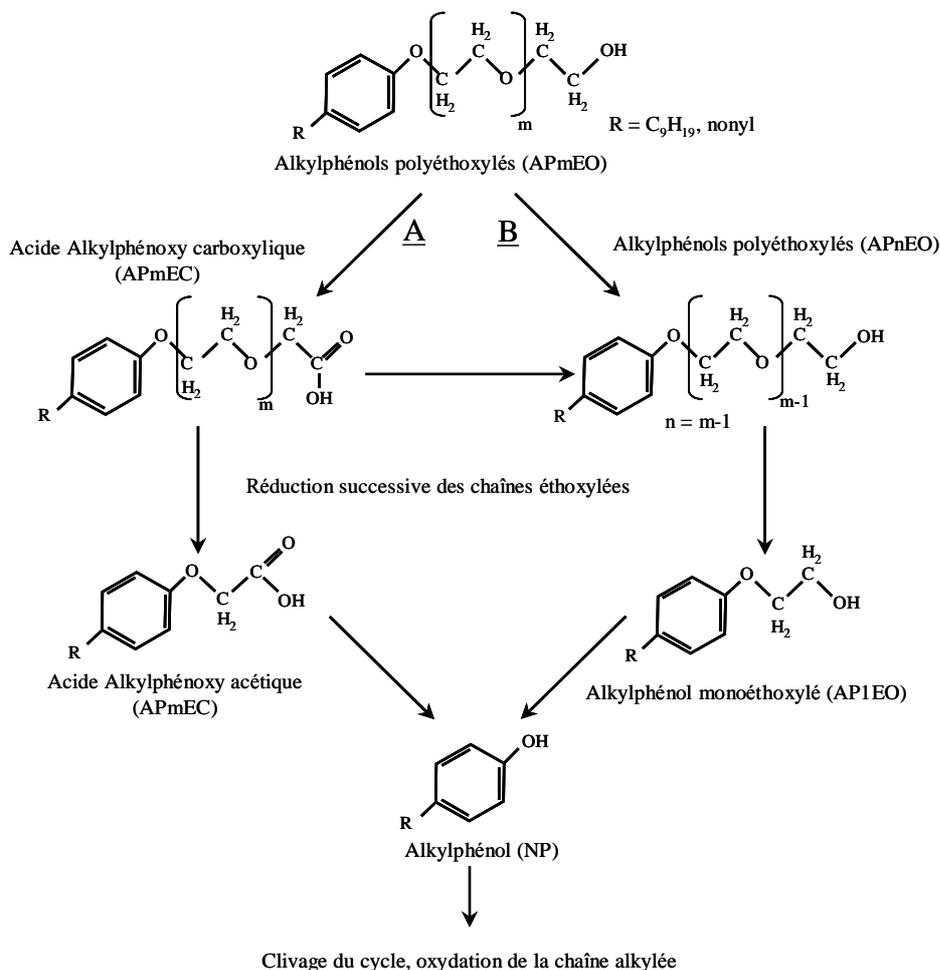


Figure 10 : Voie de dégradation des APEOs (Cailleaud, 2006).

3.3.3. Contamination des organismes vivants et réseaux trophiques

Les NPs ont tendance à se concentrer plus facilement chez les invertébrés aquatiques que chez les vertébrés. En effet, des études ont montré que les facteurs de bioaccumulation étaient de 1250 et de 3400 respectivement chez les poissons et les invertébrés (Staples et al, 1998). Ces données ont été confirmées par David et al (2009) qui ont rapporté des concentrations en APs chez les mollusques bivalves et les gastéropodes supérieures à celles détectées chez les poissons

3.3.4. Effets toxiques chez les invertébrés

L'évaluation des risques effectuée par l'Union Européenne pour les NPs a conclu à la présence de risques significatifs pour l'environnement aquatique.

Toxicité aigue

Des CL_{50} du 4-NP ont été calculés chez les vertébrés et chez les invertébrés (Tableau 13). Notamment, des CL_{50} , 96 heures de 0,23 ; 3 et 0,135 mg.L⁻¹ ont été observées respectivement chez le saumon *Salmo gairdneri*, la morue *Gadus morhua* et le tête de boule *Pimephales promelas* (McLeese et al, 1980a ; Swedmark, 1968 ; Holcombe et al, 1984).

La toxicité létale a également été mise en évidence chez les crustacés. Plus particulièrement, Granmo et al (1989), Holcombe et al (1984) et Ricciardi et al (2008) ont déterminé des CL_{50} , 96 heures chez les bivalves *Mytilus edulis*, *Tapes philippinarum* et *Crassostrea aestivalis*, de respectivement 3 ; 1,12 et 6,49 mg.L⁻¹. Parallèlement, des valeurs de CL_{50} , 96 heures de respectivement 0,4 ; 0,2 ; > 0,195 ; 1,67 ; 0,227 mg.L⁻¹ ont été obtenues chez la crevette *Crangon septemspinosa*, le Homard *Homarus americanus*, le crabe *Dyspanopeus sayi*, et les amphipodes *Corophium volutator* et *Eohaustorius estuarius*, (McLeese et al, 1980a ; McLeese et al, 1980 ; Lussier et al, 2000 ; Brown et al, 1999 ; Hecht & Boese., 2002).

Chez les copépodes, une CL_{50} , 96 h entre 0,5 et 1,0 mg.L⁻¹ a été identifiée chez *Tisbe battagliai* (Bechmann, 1999) et une CL_{50} , 48 h de 19,4 µg.L⁻¹ chez *Eurytemora affinis* (Forget-Leray et al, 2013).

Toxicité chronique

Les NPs sont également connus pour être des perturbateurs endocriniens. Plus particulièrement, des effets ont été décrits sur la reproduction et la croissance embryonnaire. En effet, une diminution de la production d'œufs a été observée après 7, 14 et 21 jours d'exposition au 4-NP chez *Daphnia magna* avec des concentrations respectivement de 0,12 ; 0,12 et 0,10 mg.L⁻¹ (Comber et al, 1993). Parallèlement, chez cette même espèce, la fécondité et le sex-ratio sont tout deux impactés à respectivement 12,5 µg.L⁻¹ et 25 µg.L⁻¹ de 4-NP (Zhang et al, 2003). Enfin, le développement embryonnaire est très fortement impacté par le 4-NP.

Tableau 13 : Valeurs de CL₅₀, 96h relevées dans la littérature chez différents organismes aquatiques lors d'exposition aux APs.

Nom commun	Espèce	CL ₅₀ (mg.L ⁻¹)	durée	Références
<i>Vertébrés</i>				
Saumon	<i>Salmo gairdeni</i>	0.23	96 h	McLeese et al, 1980a
Morue	<i>Gadus morhua</i>	3	96 h	Swedmark., 1968
Tête de boule	<i>Pimephales promelas</i>	0.135	96 h	Holcombe et al, 1984
<i>Invertébrés</i>				
Bivalves	<i>Mytilus edulis</i>	3	96 h	Granmo et al, 1989
	<i>Tapes philippinarum</i>	1.12	96 h	Matozzo et al, 2003
	<i>Crassostrea aestivalis</i>	6.49	96 h	Ricciardi et al, 2008
Daphnies	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	0.47	48 h	Ankley et al, 1990
	<i>Crangon septemspinosa</i>	0.4	96 h	McLeese et al, 1980a
	<i>Daphnia magna</i>	0.3	24 h	Comber et al, 1993
	<i>Daphnia magna</i>	0.19	48 h	Comber et al, 1993
	<i>Daphnia magna</i>	0.19	48 h	Naylor, 1995
	<i>Daphnia magna</i>	0.2	24 h	Bringman & Khun, 1982
	<i>Daphnia magna</i>	0.2	24 h	McLeese et al, 1980
Lobster	<i>Homarus americanus</i>	0.2	96 h	McLeese et al, 1980
Crabe	<i>Dyspanopeus sayi</i>	> 0,195	96 h	Lussier et al, 2000
Amphipode	<i>Corophium volutator</i>	1.67	96 h	Brown et al, 1999
	<i>Eohaustorius estarius</i>	0.227	96 h	Hecht & Boese, 2002
Copépodes	<i>Tisbe battagliai</i>	0,5-0,10	96 h	Bechmann, 1999
	<i>Eurytemora affinis</i>	0,02	48h	Forget-Leray et al, 2013

Plus particulièrement, des études réalisées sur les bivalves *Crassostrea gigas* et *Tapes philippinarum* ont démontré un impact sur la croissance embryonnaire (Nice et al, 2003 ; Matozzo

et al, 2003). Brown et al (1999) et Zhang et al (2003), à des concentrations de 71 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 263 $\mu\text{g.L}^{-1}$ observent des effets sur le développement respectivement chez l'amphipode *Corophium volutator* et la daphnie *Daphnia magna*. Forget-Leray et al (2005) ont également démontré que le 4-NP était capable de ralentir la croissance des nauplii du copépode *E. affinis* à partir de 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Le caractère embryotoxique a également été démontré chez *D. magna* par Leblanc et al (2000). Les NPs altèrent également le métabolisme de la testostérone, diminuent la fécondité, modifient le sex-ratio, affectent le développement morphologique de la daphnie (EU, 2002, Servos 1999), et réduisent la diversité zooplanctonique (O'halloran et al, 1999).

3.4. Contaminations microbiologiques

Le bassin versant de l'estuaire de Seine est soumis à une forte pression anthropique due à des rejets urbains et agricoles, entraînant une contamination bactérienne d'origine fécale humaine et animale. Cette contamination microbiologique des eaux de l'estuaire est dépendante de la localisation géographique et des conditions de débits (Garcia-Armissen et al, 2005 ; Touron et al, 2005, 2007 ; Laroche et al, 2009). Notamment, en période de crue ($> 500 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$), la contamination fécale (*E. coli*, *Enterococcus*) de l'estuaire est dominée par les apports amont provenant de la principale STEP de l'agglomération parisienne (Garcia-Armissen et al, 2005 ; Touron et al, 2007). Au contraire, en période de bas débits ($< 300 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$), la contamination fécale est principalement attribuable aux rejets humains de STEP intra-estuariennes et aux apports des affluents (Garcia-Armissen et al, 2005 ; Touron et al, 2007 ; Laroche et al, 2009). Les bactéries d'origine fécale telles qu'*E. coli* (bactéries allochtones) cohabitent dans l'estuaire avec des bactéries pathogènes autochtones comme *Vibrio spp.* Les bactéries du genre *Vibrio* sont ainsi présentes dans les eaux estuariennes ou côtières, et dans des zones aux climats tempérés ou tropicaux, la diversité en espèce des populations de *Vibrio* variant en fonction des saisons (Thompson et al, 2004). En milieu estuarien, les principales espèces de *Vibrio* associées à des pathologies humaines sont *V. cholerae* (O1 et O139) responsable du choléra, et des espèces qui contaminent l'homme après consommation de fruits de mer comme *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*. *V. parahaemolyticus* est une bactérie halophile (cultivable entre 0,5 et 10 % de NaCl) présente dans les estuaires et les espaces côtiers. Elles sont surtout recensées dans les milieux de salinité intermédiaire à des températures situées entre 15 et 20 °C. *V. parahaemolyticus* est une bactérie fréquemment associées aux sédiments et colonisant le plancton (Anses 2012). Entre 1995 et 2010, plusieurs cas de gastro-entérites ont eu pour origine *V. parahaemolyticus*, associé à la consommation de produits de la mer. Les copépodes sont vulnérables à la contamination par des bactéries pathogènes

autochtones telles que *V. parahaemolyticus* et allochtones comme *E. coli*. Les copépodes, situés à la base du réseau trophique, peuvent donc jouer un rôle de vecteur de contamination fécale.

4. Copépode *Eurytemora affinis*

4.1. Zooplancton

Le zooplancton constitue le principal compartiment animal aquatique en termes de biomasse et de diversité (Mauchline, 1998). Par opposition au necton, c'est la fraction animale aquatique dont l'activité natatoire n'est pas suffisante pour lutter contre les courants. Le zooplancton comporte un grand nombre d'espèces appartenant à de nombreux taxons différents. Certaines de ces espèces sont planctoniques toute leur vie ; on parle alors d'espèces holoplanctoniques.

Le plancton est classé en fonction de la taille des espèces qui le composent :

- mégazooplancton (20-200 cm) : méduses, crevettes...
- macrozooplancton (2-20 cm) : crevettes...
- mésozooplancton (0,2 mm-2 cm), copépodes, rotifères, cladocères...
- microzooplancton (20-200 μm) : larves nauplii, plutei, trochophores, véligères...
- nanoplancton (2-20 μm) : flagellés...
- picozooplancton (0,2-2 μm) : protistes...

Le plancton dont la taille est inférieure à celle des organismes picozooplanctoniques est principalement représenté par le phytoplancton, les bactéries et les virus.

De par son importance en terme de biomasse, le zooplancton est, avec le phytoplancton, à la base des réseaux trophiques des milieux aquatiques. Le phytoplancton, premier maillon de ces chaînes alimentaires, est le principal producteur primaire capable de fixer le carbone sous forme matière organique par photosynthèse (organisme photoautotrophe). Le zooplancton est considéré comme un consommateur primaire (organisme hétérotrophe) puisqu'il est un important consommateur du phytoplancton (Atkinson, 1996). Il rend ainsi disponible cette matière organique aux animaux prédateurs, particulièrement les larves et les juvéniles de poisson. Le lien proie-prédateur existant entre le phytoplancton et le zooplancton fait que la dynamique de population de l'un influe directement sur celle de l'autre (Hashioka & Yamanaka, 2007 ; Sinistro et al, 2007). Le zooplancton remonte en général en surface la nuit afin de s'alimenter. En sédimentant, les cadavres et fèces du zooplancton (tripton) contribuent fortement à alimenter les espèces vivant dans les couches pélagiques plus profondes ou les espèces benthiques. Le tripton participe ainsi au cycle biogéochimique comme source de carbone.

4.2. Systématique des copépodes

Parmi les taxons composant le zooplancton, le sous-embranchement des crustacés est celui qui montre la plus grande diversité d'espèces avec la plus forte biomasse ; la sous-classe des copépodes en représente la majeure partie. Humes (1994) a estimé à 11 500 le nombre d'espèces de copépodes décrites à la fin des années 1990, réparties en 10 ordres, 200 familles et 1 650 genres (figures 11 et 12) et considère que seules 15% des espèces existantes sont connues.

Certains ordres se sont adaptés à des types d'habitats spécifiques (Boxshall & Halsey, 2004) *e.g.* marin, saumâtre, eau douce, eau profonde, cave, systèmes karstiques d'une part, et à différents modes de nutrition *e.g.* omnivore, prédateur, phytoplanctonophage ou parasite d'autre part. Ils sont ainsi répartis sur l'ensemble du globe (figure 13).

Une description détaillée de la phylogénie des copépodes et leur répartition a été décrite par Mauchline (1998) ou peut être consultée sur le site de l'observatoire de Banyuls (<http://copepodes.obsbanyuls.fr/en/index.php>).

Le copépode *Eurytemora affinis* appartient à l'ordre des calanoïdes. Cet ordre, essentiellement omnivore et phytoplanctonophage, joue un rôle majeur dans les chaînes trophiques aquatiques et inclut les espèces de copépodes les plus abondantes sur la planète.

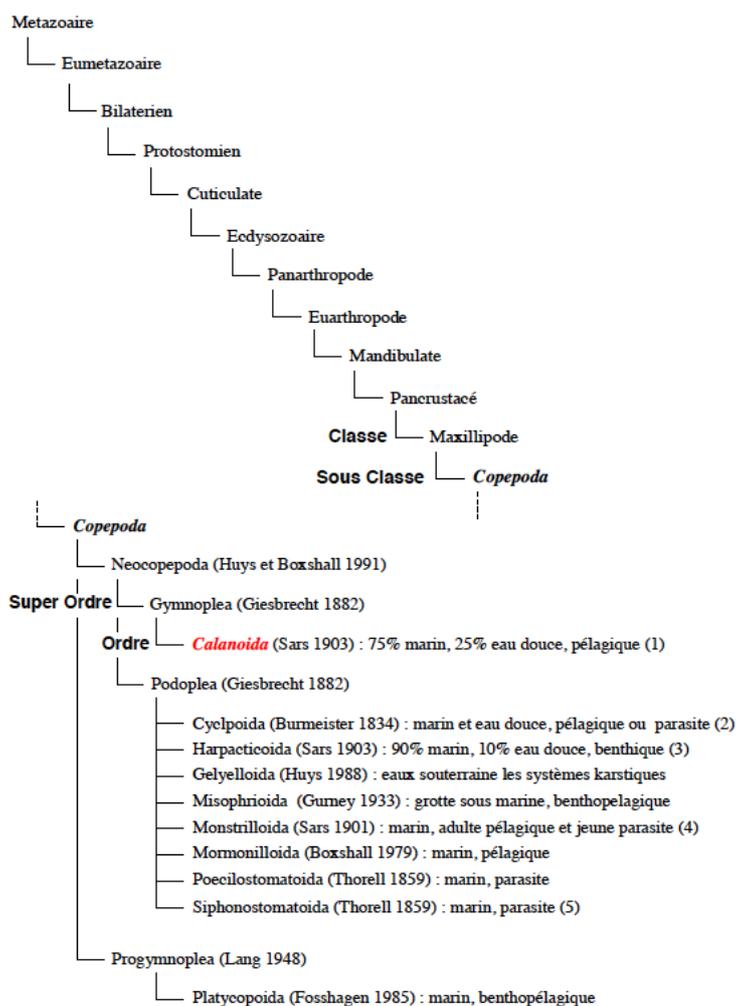


Figure 11 : Phylogénie des copépodes (Devreker, 2007).

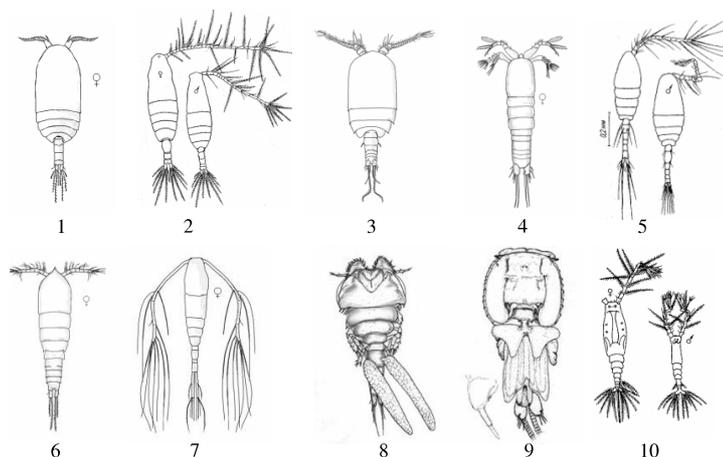


Figure 12 : Les différentes classes de copépodes (1 : platycopioïda, 2 : calanoïda, 3 : misophrioïda, 4 : gelyelloïda, 5 : cyclopoïda, 6 : harpacticoida, 7 : mormonilloïda, 8 : poecilostomatoida, 9 : siphonostomastoida, 10 : monstrilloïda. <http://www.obs-vlfr.fr>).

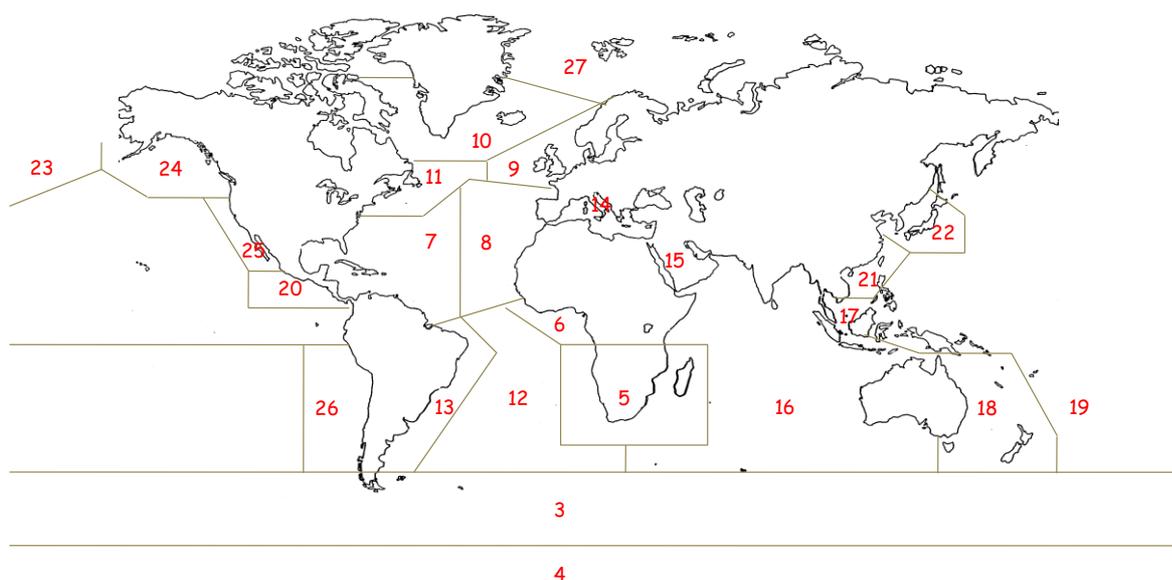


Figure 13 : Répartition géographique des copépodes (<http://copepodes.obsbanyuls.fr/en/index.php>). 3 : Subantarctique 293 espèces, 4 : Antarctique 296 espèces, 5 : Afrique du Sud 454 espèces, 6 : Golf de Guinée 341 espèces, 7 : Mer des Antilles 716 espèces, 8 : Ile du Cap Vert 745 espèces, 9 : Irlande 381 espèces, 10 : Islande du Sud 204 espèces, 11 : Cap Cod 261 espèces, 12 : Atlantique Sud Central 329 espèces, 13 : Brésil Argentine 381 espèces, 14 : Mer Noire - Mer méditerranée 559 espèces, 15 : Mer Rouge 259 espèces, 16 : Océan Indien 964 espèces, 17 : Golf de Thaïlande 635 espèces, 18 : Australie 518 espèces, 19 : Pacifique Tropical Central 535 espèces, 20 : Pacifique Tropical Est 481 espèces, 21 : Mer de Chine 608 espèces, 22 : Mer du Japon 679 espèces, 23 : Pacifique Nord Ouest 353 espèces, 24 : Pacifique Nord est 292 espèces, 25 : Golf de Californie 440 espèces, 26 : Chili 435 espèces, 27 : Océan Arctique 177 espèces.

4.3. Répartition géographique et écologie du copépode *Eurytemora affinis*

Etymologiquement, le terme copépode provient du grec 'Kope' signifiant rame et 'Podos' signifiant pied faisant référence à ses pattes en forme de rames.

4.3.1. Généralités

Les estuaires sont des zones de mélange entre les eaux salées marines et les eaux douces continentales. Ces mélanges se font au cours des cycles de marée, alternance haute mer / basse mer, d'environ 12 h. Cette variation de la salinité représente une très forte pression de sélection, à laquelle : seule quelques espèces fortement adaptées sont capables de survivre. Parmi ces espèces, figurent les copépodes estuariens, et plus particulièrement, *Eurytemora affinis*, espèce certainement la plus représentée et l'une des plus étudiées. Elle est présente dans un très grand nombre d'estuaires de l'hémisphère nord et y est souvent l'une des bases essentielles de leurs chaînes trophiques (Fockedey & Mees, 1999 ; Winkler & Greve, 2004). *E. affinis* peut aussi être rencontrée dans des milieux d'eau douce (Lac Ohnuma, Ban, 1994) ou hyper-salés (Lee, 1999). Dans les estuaires, cette espèce est typique des zones oligo-mésohalines à salinité comprise entre 0 et 18 voire plus (Vaupel-Kleine & Weber, 1975 ; Mouny et al, 1998 ; Lawrence et al, 2004).

E. affinis est une espèce dominante du zooplancton dans la majorité des estuaires de l'hémisphère nord. Roddie et al (1984) ont montré que cette espèce pouvait s'acclimater très rapidement (12h) aux variations de salinité démontrant qu'*E. affinis* est une espèce parfaitement adaptée aux milieux estuariens dans lesquels la salinité varie fortement à l'échelle de la journée. Cette capacité d'osmorégulation est liée à la présence de structures spécialisées dans l'échange d'ions au niveau des glandes maxillaires et de 4 de ses paires de pattes natatoires (organes « Crusalis » ; Johnson et al, 2014). Roddie et al (1984) ont également montré que l'hémolymphe d'*E. affinis* était hyperosmotique en dessous d'une salinité de 15 et hypo-osmotique au-dessus de 20. Gonzalez & Bradley (1994) ainsi que Kimmel & Bradley (2001) ont par la suite démontré que cette osmorégulation se faisait par le biais d'un métabolisme protéique (*i.e.* dégradation ou synthèse) et que celui-ci était largement influencé par la température. *E. affinis* présente ainsi peu de changements dans l'expression de ses protéines dans des salinités comprises entre 5 et 15 et à des températures de 10°C et 15°C. A l'inverse, le métabolisme protéique devient plus actif à une salinité de 20 et une température de 25°C montrant que ces conditions sont plus limitantes (stressante) pour cette espèce. Ils ont aussi suggéré que cette relation température-salinité pouvait avoir un impact sur la répartition spatiale de l'espèce (*i.e.* gradient de salinité estuarien) en fonction

des saisons. La capacité d'acclimatation aux variations de salinité et de température possède une certaine variabilité d'origine génétique (Bradley, 1986) et peut donc être soumis à sélection naturelle et ainsi diverger d'un estuaire à un autre. Cependant, la capacité à se maintenir dans des zones de salinité spécifique fait d'*E. affinis* un bon indicateur des masses d'eau estuarienne (Wilson, 1994).

4.3.2. L'estuaire de Seine

Comparativement aux autres estuaires, les travaux menés en estuaire de Seine sur le zooplancton, et *E. affinis* en particulier, y sont relativement récents. La dynamique des édifices biologiques de l'estuaire de la Seine, y compris celle d'*E. affinis*, a été étudiée au cours de la première phase du programme scientifique Seine-Aval (Mouny, 1998 ; Mouny & Dauvin, 2002). Ces premiers travaux ont porté sur la dynamique de population *in situ* de l'espèce et il a fallu attendre 2004 et les phases II et III du programme Seine-Aval pour voir les premières expériences réalisées en laboratoire sur cette population (Devreker et al, 2005 ; Forget et al, 2002 ; Forget-Leray et al, 2005 ; Cailleaud et al, 2006, 2009, 2011). De nombreuses thématiques ont été abordées pour étudier cette espèce dans l'estuaire de la Seine. Une approche écotoxicologique a notamment été développée autour de cette espèce. Les capacités de bio-accumulation d'*E. affinis* ont été mises en évidence (Cailleaud et al, 2007 a et b) et les effets des principaux contaminants organiques présents dans l'estuaire de la Seine (*i.g.* PCBs, HAPs) sur le cycle de vie (Forget-Leray et al, 2005 ; Cailleaud et al, 2011), le comportement natatoire (Cailleaud et al, 2011) et l'activité enzymatique (Forget et al, 2002 ; Cailleaud et al, 2008) de cette espèce ont été étudiés.

4.4. Morphologie et clefs de détermination des calanoïdes

L'organisation générale des copépodes peut varier selon les espèces. Cette variation complique leur identification qui nécessite, dans certains cas, une dissection afin de différencier leurs appendices. Cette identification est d'autant plus complexe qu'un grand nombre d'individus immatures sont récoltés lors des échantillonnages.

Les calanoïdes adultes (figure 14) sont constitués, dans leur partie supérieure, d'un céphalothorax, lui-même divisé en (i) céphalosome contenant les pièces buccales, les antennes et les antennules et (ii) métasome comprenant 5 segments comptant chacun une paire de pattes natatoires. La 5^{ème} paire de pattes est modifiée en appendice génital fortement différencié et

asymétrique chez les mâles ; elles servent à manipuler le spermatophore pendant l'accouplement (Katona, 1975). La partie inférieure du copépode est constituée par l'urosome lui-même divisé en plusieurs segments, dont le nombre varie généralement entre les mâles et les femelles et se termine par la furca.

Les antennules comme les pattes natatoires ont un rôle essentiel dans la locomotion des copépodes. Par battements successifs, elles permettent au copépode d'effectuer des sauts lui permettant de percevoir son environnement : en effet, grâce aux mécanos et chémorécepteurs qui les composent, le copépode peut détecter la présence de prédateurs ou de nourriture (Poulet et al, 1986 ; Tiseluis, 1992). Grâce à leur allongement et aux spicules qui les parcourent, elles confèrent aussi une meilleure flottabilité au copépode (Strickler, 1992). Chez les mâles, une (ou les deux) antennule(s) est (sont) modifiée(s) ; elle(s) possède(nt) une articulation (antenne(s) géniculée(s)) qui lui permet, pendant la reproduction, de saisir la femelle (Katona, 1975).

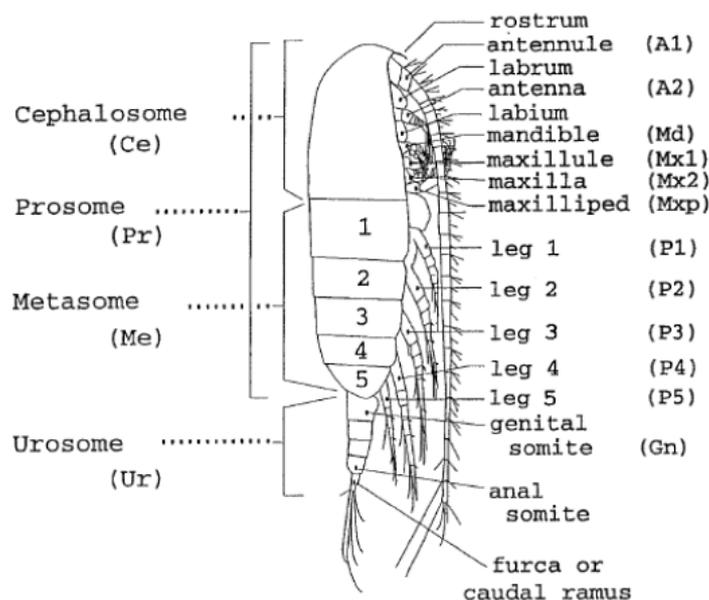


Figure 14 : Morphologie externe et appendices d'un copépode calanoïde femelle (d'après Mauchline, 1998). Le métasome est délimité en 5 segments bien définis (1-5). Chaque segment comporte une paire de pattes (leg 1-5). La 5ème paire de pattes est généralement différenciée entre le mâle et la femelle.

Les antennes servent aussi à la locomotion mais sur des distances plus courtes et de manière continue en créant des courants autour de l'animal. Ces courants, dits alimentaires, servent aussi à amener la nourriture au niveau des pièces buccales du copépode (Yen & Strickler, 1996). Ce type de déplacement est particulièrement adapté lors du broutage du phytoplancton (Costello et al, 1990).

4.5. Reproduction et développement des calanoïdes

4.5.1. Reproduction

Le copépode *E. affinis* possède exclusivement une reproduction sexuée (oviparité) toute l'année entre adultes mâle et femelle. Dans un premier temps, le mâle mature est attiré par la femelle via des phéromones libérées dans le milieu (Katona, 1973 ; Lonsdale et al, 1998). Ces phéromones possèdent un champ d'action relativement large puisque le mâle peut repérer la femelle à plus de 10 cm (ce qui représente 100 fois sa taille en moyenne). Une fois la femelle repérée, le mâle capture et l'immobilise à l'aide d'une antennule différenciée en un organe préhensible muni d'une articulation géniculée. Le mâle fixe par la suite des spermatophores à proximité du segment génital de la femelle. Le contenu du spermatophore peut alors être transféré

vers une spermathèque ou peut être conservé tel quel par la femelle. La femelle a la possibilité d'avoir plusieurs spermatophores de différents mâles accrochés près de son segment génital permettant un brassage génétique (Titelman et al, 2007).

4.5.2. Cycle de vie

Quelques heures après la fécondation, un sac ovigère est formé contenant 20 à 60 œufs (selon le nombre de fécondation connue par la femelle ; figure 15). Les œufs éclosent en quelques jours. Le temps entre éclosion et apparition d'un nouveau sac ovigère- dépend des paramètres abiotiques du milieu : à une salinité de 15 et à 15 °C, le temps de latence chez le copépode *E. affinis* est de 1 jour (Devreker et al, 2009). Le temps entre l'apparition du sac ovigère et l'éclosion des œufs est appelé temps de développement embryonnaire. Ce temps dépend également des conditions abiotiques : à une salinité de 15 et 15°C, le temps de développement est de 2 jours (Devreker et al, 2009).

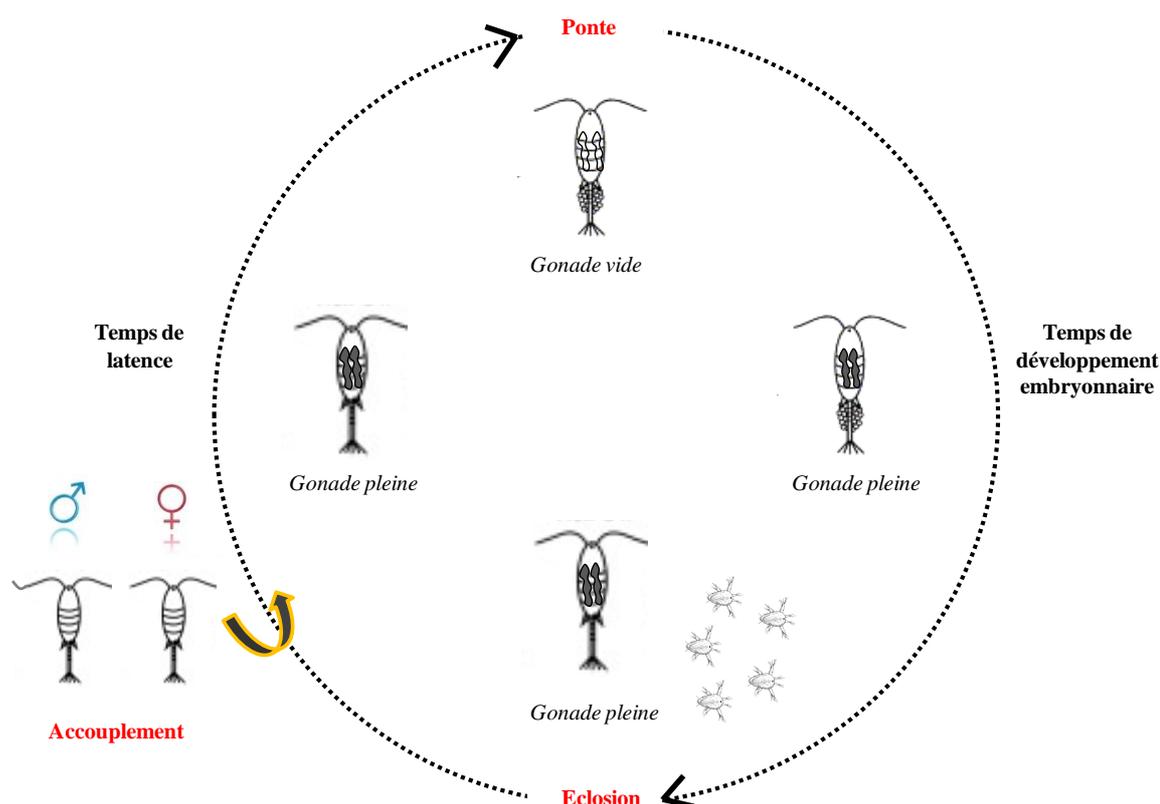


Figure 15 : Cycle de reproduction du copépode *E. affinis* (adapté d'après Dur et al, 2009).

Le développement d'*E. affinis* dure entre 18 et 21 jours et dépend essentiellement des conditions abiotiques (Katona et al, 1971). Il comporte 3 phases avec, pour chacune d'elles, des stades distincts (figure 16). Le passage d'un stade à l'autre nécessite une mue. La première phase

du copépode *E. affinis* est la phase nauplienne comptant 6 stades N1 à N6. La durée de la phase nauplienne dépend des conditions abiotiques du milieu. Ainsi, Devreker et al (2004) ont montré qu'à une salinité de 15 et à 15 °C, le temps de développement larvaire était de 7 jours. La deuxième phase du copépode est la phase copépodite comptant 5 stades C1 à C5, la différenciation sexuelle débutant au stade C4. Enfin, la dernière phase est la phase adulte, au cours de laquelle le copépode atteint sa maturité sexuelle. Une fois adulte, la croissance des copépodes s'arrête, ainsi que la mue. Les stades nauplii sont morphologiquement très différenciés des stades copépodites qui eux sont proches du stade adulte.

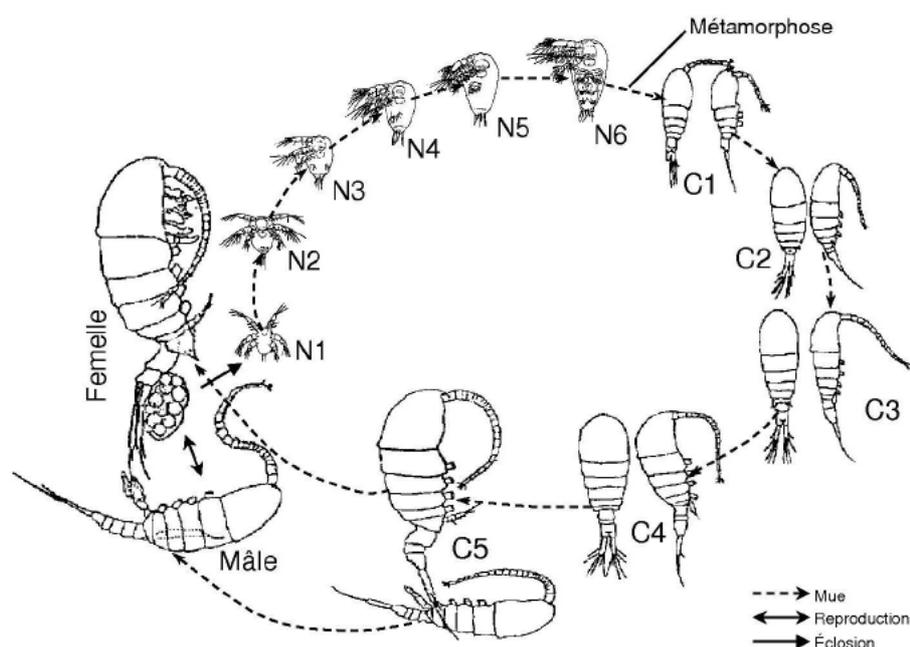


Figure 16 : Cycle de développement d'un copépode calanoïde. Ni et Ci correspondent respectivement aux différents stades larvaires i.e .nauplii et juvéniles i.e.copépodites (d'après Katona, 1971 et modifié par Souissi S.).

5. Utilisation des copépodes comme espèces modèles en écotoxicologie

5.1. Tests de toxicité aiguë

Au même titre que les cladocères (daphnies), les copépodes sont régulièrement utilisés pour tester la toxicité aiguë de substances chimiques ou de matrices environnementales contaminées. En effet, les copépodes sont connus comme étant des espèces sensibles aux xénobiotiques, et sont ainsi couramment utilisés comme cibles pour des tests écologiques assimilés à des risques environnementaux (Kusk & Petersen, 1997 ; Raisuddin et al, 2007). Les copépodes sont très largement employés dans les essais de toxicité (Bengtsson & Tarkpea, 1995), incluant des

expositions sur les premiers stades (Moraïtou-Apostolopoulo & Verriopoulos, 1982 ; O'Brien et al, 1988 ; Hutchinson et al, 1994) et tout au long du cycle de vie (Daniels & Allan, 1981 ; Allan & Daniels, 1982 ; Bechman 1994). Les copépodes sont également couramment utilisés dans le cadre d'exposition à des sédiments (Perez-Landa & Simpson, 2011 ; Prato et al, 2012 ; Araujo et al, 2013 ; Stringer et al, 2014).

Différents contaminants ont été testés afin d'évaluer leur toxicité sur les copépodes. Ainsi, Forget et al (1998), Mc Henery et al (1991) et Thain et al (1990) ont testé la toxicité d'insecticides (Carbofuran, Dichlorvos, Malathion) chez différentes espèces de copépodes et sur différents stades de vie. Forget et al (1998) et Hutchinson et al (1994) ont également étudié la toxicité de métaux (Cd) sur différentes espèces de copépodes. Les copépodes ont également été très utilisés pour évaluer la toxicité des HAPs, du naphatalène, du 1,2 diméthylnaphtalène, du phénanthrène, du fluoranthène et de l'huile de diesel (Calbet et al, 2007 ; Lotufo, 1996). De plus, la toxicité de HAPs (phénanthrène et fluoranthène) associés à des sédiments a été étudiée chez deux espèces de copépodes *i.e.* *Nitocra lacustris* et *Shizopera knabeni* (Lotufo & Fleeger, 1997 ; Lotufo, 1998). Enfin, Bechmann (1999) a évalué la toxicité du nonylphénol chez le copépode *Tisbe battagliai*. Les principales données de toxicité aiguë chez les copépodes disponibles dans la littérature ont été répertoriées dans le tableau 14.

5.2. Tests de toxicité chronique

Les copépodes sont caractérisés par un cycle de vie court, inférieur à un mois (de la reproduction jusqu'au stade adulte). Ce sont des organismes faciles à maintenir en élevage. La plupart des espèces à cycle de vie court constituent de bons modèles pour évaluer la toxicité de contaminants sur des traits d'histoire de vie (Chandler 1990 ; Strawbridge et al, 1992 ; DiPinto et al, 1993 ; Green & Chandler, 1996). Les copépodes sont des organismes intéressants pour tester rapidement les effets des contaminants sur différents stades de développement et sur plusieurs générations.

Tableau 14 : Valeurs de CL50 en $\mu\text{g.L}^{-1}$ (noir, eau) et $\mu\text{g.g}^{-1}$ (bleu, sédiment) déterminées chez des copépodes et relevées dans la littérature.

Espèces	Pesticides					Métaux	Références
	Atrazine	Carbofurane	Dichlorvos	Malathion	Arsenic	Cadmium	
Copépodes estuariens							
<i>Eurytemora affinis</i>	500 $\mu\text{g.L}^{-1b}$						Hall et al, 1995
<i>Eurytemora affinis</i>						147,7 $\mu\text{g.L}^{-1b}$	Cripe & Cripe, 1990
<i>Acartia tonsa</i>	92-210 $\mu\text{g.L}^{-1b}$						Ward & Ballantine, 1985
<i>Acartia tonsa</i>						90 $\mu\text{g.L}^{-1b}$	Cripe & Cripe, 1990
Copépodes marins							
<i>Tisbe battagliai</i>							
Adultes			141 $\mu\text{g.L}^{-1b}$				McHenry et al, 1991
Adultes						460 $\mu\text{g.L}^{-1b}$	Hutchinson et al, 1994
Nauplii			24 $\mu\text{g.L}^{-1b}$				Thain et al, 1990
Nauplii						340 $\mu\text{g.L}^{-1b}$	Hutchinson et al, 1994
<i>Tigriopus brévicornis</i>							
Nauplii	120,9 mg.L^{-1d}	17,7 mg.L^{-1d}	0,92 mg.L^{-1d}	7,2 mg.L^{-1d}	10,9 mg.L^{-1d}	17,4 mg.L^{-1d}	Forget et al, 1998
Copépodites	124,5 mg.L^{-1d}	36,5 mg.L^{-1d}	2,9 mg.L^{-1d}	20,5 mg.L^{-1d}	19,8 mg.L^{-1d}	29,7 mg.L^{-1d}	Forget et al, 1998
Femelles ovigères	153,2 mg.L^{-1d}	59,9 mg.L^{-1d}	4,6 mg.L^{-1d}	24,3 mg.L^{-1d}	27,5 mg.L^{-1d}	47,9 mg.L^{-1d}	Forget et al, 1998
Nauplii						78 $\mu\text{g.L}^{-1b}$	Le Dean & Devineau, 1987
Espèces	NAPH	C2-NAPH	Phénanthrène	Fluorentène	Huile de diesel	Références	
<i>Paracartia grani</i>	2,535 $\mu\text{g.L}^{-1a}$	161 $\mu\text{g.L}^{-1a}$				Calbet et al, 2007	
<i>Schizopera knabeni</i>							
Femelles			105 $\mu\text{g.g}^{-1c}$			Lotufo & Fleeger, 1997	
Femelles				213 $\mu\text{g.g}^{-1c}$		Lotufo, 1998	
Femelles			473 $\mu\text{g.g}^{-1d}$	2100 $\mu\text{g.g}^{-1d}$	194 $\mu\text{g.g}^{-1d}$	Lotufo, 1996	
Mâles			72 $\mu\text{g.g}^{-1c}$			Lotufo & Fleeger, 1997	
Copépodites			43 $\mu\text{g.g}^{-1c}$			Lotufo & Fleeger, 1997	
Nauplii			71 $\mu\text{g.g}^{-1c}$			Lotufo & Fleeger, 1997	
<i>Nitocra lacustri</i>							
Femelles			345 $\mu\text{g.g}^{-1c}$			Lotufo & Fleeger, 1997	
Mâles			349 $\mu\text{g.g}^{-1c}$			Lotufo & Fleeger, 1997	
Copépodites			172 $\mu\text{g.g}^{-1c}$			Lotufo & Fleeger, 1997	
Nauplii			84 $\mu\text{g.g}^{-1c}$			Lotufo & Fleeger, 1997	
<i>Coullana spp</i>				132 $\mu\text{g.g}^{-1c}$		Lotufo, 1998	

Les principaux paramètres sub-létaux évalués chez les copépodes sont le temps de développement et la reproduction. Breitholz & Wollenberger (2003) ont montré que les retardateurs de flammes bromés (PBDEs) augmentaient le temps de développement larvaire chez *Nitocra spinipes* et *Acartia tonsa* après une exposition de 5 jours aux BDE 47, CBDE 47, et CBDE 99). Lindley et al (1999) ont montré des effets sur la viabilité des nauplii et la production d'œufs chez le copépode *Acartia bifilosa* exposés pendant 16 heures au pentachlorophénol (PCP) et au dichlorobenzène (DCB). De même, Ott et al (1978) ont démontré des effets sur la croissance et le nombre d'œufs lors d'exposition d'*E. affinis* au naphthalène, au méthyl-naphthalène, au diméthyl-naphthalène et au triméthyl-naphthalène. Forget et al (2005) ont également mis en évidence des effets sur la croissance et le sex-ratio des nauplii du copépode *E. affinis* exposés pendant 10 jours à l'E2, au BaP, au 4-NP, au DEHP et à l'atrazine. Lotufo (1996, 1997) et Calbet et al (2007) ont démontré que des sédiments contaminés par des HAPs diminuaient la production de nauplii et la prise de nourriture de *Tigriopus japonicus*. Guo et al (2012) ont observé chez cette même espèce de copépode un effet toxique des PCB 126 sur sa reproduction et sa croissance. Enfin, Brown et al (2003) et Wollenberg et al (2003) ont montré respectivement que des expositions au lindane et à de faibles concentrations de muscs synthétiques augmentaient la durée de développement de *Bryocamptus zschokkei* et *Acartia tonsa* respectivement.

6. Principaux outils en écotoxicologie

Les analyses chimiques sont des outils très utilisés pour évaluer la contamination de l'environnement. Néanmoins, elles ne reflètent pas la fraction de contaminants réellement absorbée par l'organisme et n'intègre pas les réponses biologiques associées à la contamination d'un milieu sur un organisme. Ces mesures ne constituent donc pas un outil performant en écotoxicologie. C'est pourquoi, les biologistes ont développé de nouveaux outils permettant d'intégrer les effets biologiques d'organismes soumis à une contamination.

La définition originale de l'écotoxicologie est généralement attribuée à Truhaut (1977) qui définit cette science comme étant « la branche de la toxicologie qui étudie les effets toxiques provoqués par des substances naturelles ou les polluants d'origine synthétique sur les constituants des écosystèmes animaux, y compris l'homme, végétaux et microorganismes, dans un contexte intégré ». Plus précisément, l'écotoxicologie est la discipline qui étudie les effets de perturbations physiques et chimiques sur les êtres vivants, les voies de transfert des contaminants et leurs actions sur l'environnement (Truhaut, 1977). L'écotoxicologie peut évaluer l'impact d'un contaminant à

différents niveaux d'organisation biologique *e.g.* subcellulaire, cellulaire, tissulaire, individuel, populationnel et écosystémique (figure 17).

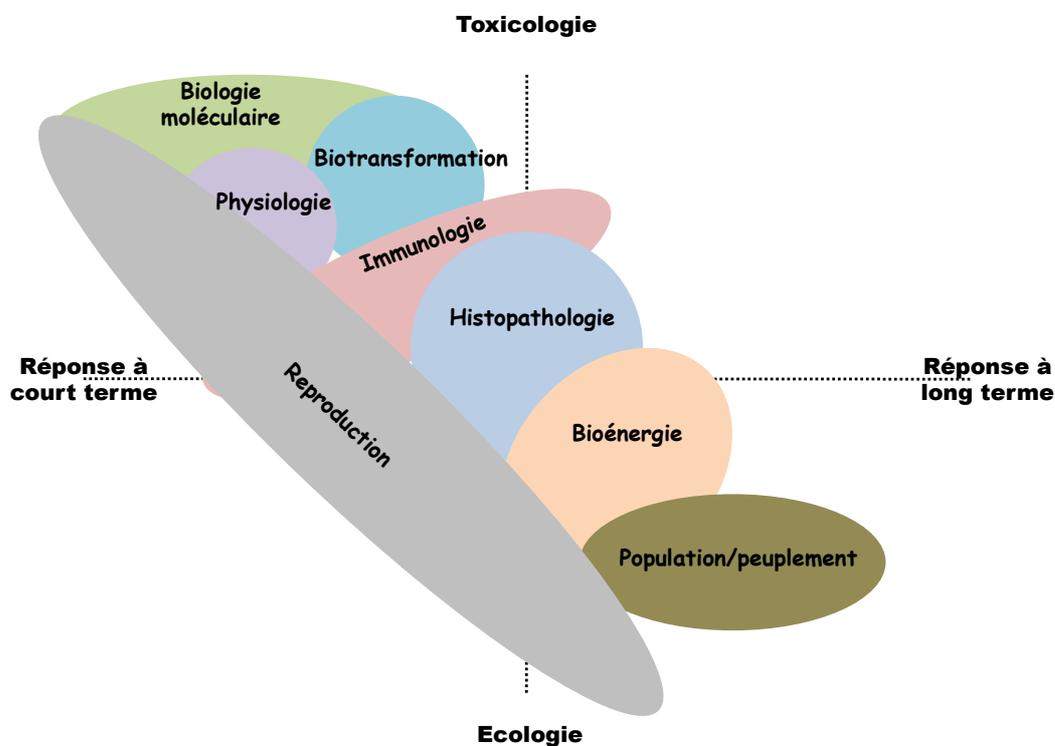


Figure 17 : Diagramme d'Adams et al, 1989.

6.1. Bio-essais

Les bio-essais - encore appelés bio-tests ou essais biologiques - ont pour objectif d'évaluer les réponses biologiques chez des organismes soumis à différentes concentrations d'un composé. Les essais biologiques présentent les caractéristiques suivantes :

- (i) ils sont rapides et peu coûteux,
- (ii) ils permettent d'évaluer la toxicité de tout type de matrice,
- (iii) ils reflètent les effets de la fraction réellement biodisponible des contaminants,
- (iv) ils peuvent mettre en évidence la présence de contaminants non décelés par une analyse chimique, ou que les méthodes analytiques actuelles ne permettent pas de doser,
- (v) ils sont réalisés en milieux contrôlés, les effets de facteurs abiotiques pouvant rendre l'analyse délicate.

Les essais biologiques permettent d'évaluer l'impact de contaminants sur de multiples traits

de vie d'un organisme tels que la survie, la croissance, le sex-ratio, la fertilité et la fécondité. Certains de ces paramètres peuvent par la suite alimenter des modèles prédictifs d'effets sur la population.

Les bio-essais ont toutefois leurs limites. En effet, leur signification écologique est parfois difficile à interpréter.

6.2. Biomarqueurs

6.2.1. Généralités

Les biomarqueurs peuvent constituer une alternative ou être intégrés aux bio-essais. Si l'utilisation de biomarqueurs a été principalement développée chez les vertébrés, un développement significatif de l'utilisation de ces outils a été réalisé ces dernières années chez les invertébrés (McCarthy & Shugart, 1990 ; Huggett et al, 1992 ; Peakall, 1992 ; Fossi & Leonzio, 1994 ; Cannon et al, 2012 ; Mouneyrac & Aniard-Triquet, 2013). Initialement, les biomarqueurs ont été définis comme étant une réponse biologique à un ou plusieurs composés chimiques permettant de mesurer une exposition présente ou passée ainsi qu'un effet toxique (Peakall, 1994). Une définition plus précise est proposée par Lagadic et al (1997) qui considère les biomarqueurs comme des changements observables et / ou mesurables au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèlent l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant.

Tableau 15 : Exemples de biomarqueurs utilisés en écotoxicologie en fonction du niveau d'organisation biologique étudié (d'après Vasseur et Cossu-Leguillee, 2003).

Échelle	Moléculaire/cellulaire	Tissus	Organisme entier (animal)	Organisme entier (végétal)
	Interprétation potentielle	Alarme	Dommage effectif	Pronostic sur la performance
Type de perturbations			Pronostic sur la performance	Pronostic sur la performance
Altération du développement			Déformation larvaire	Déformation cellulaires
Métabolisme Stress général	Allocation énergétique cellulaire (AEC), stabilité lysosomale, stress oxydatif	Histologie	Indice de condition (poids organe/poids organisme ; taille/poids), résistance à l'exondation (bivalve)	Qualité de la production photosynthétique
Métabolisme Défense	Protéines multi, xénobiotique, résistance (MXR), métallothionéines (MT), cytochrome P450 induction (EROD), glutathion-S-Transférase, phytochélatines			
Neurotoxicité	Acétylcholinestérase (AChE)			
Reprotoxicité	Vitellogénine (Vtg)	Histologie	Imposex, intersex	
Génotoxicité	Adduits ADN, essai comète, micronoyaux			
Taux physiologique			Battement cardiaque, consommation d'oxygène, nutrition	Respiration, composition lipidique
Comportement			Mouvement	Mouvement

Les biomarqueurs ont pour intérêt majeur d'apporter une réponse précoce sur l'état de santé de l'individu. Il convient cependant d'ajouter que la mesure d'un biomarqueur au niveau individuel, voire sub-individuel, ne trouve sa signification écotoxicologique que lorsqu'il permet de décrire, d'expliquer voire de prédire des effets éventuels sur les populations et les communautés. Il a été mis en évidence que les biomarqueurs étaient présents à tous les niveaux d'organisation biologique depuis la molécule jusqu'à l'individu (tableau 15 ; figure 18).

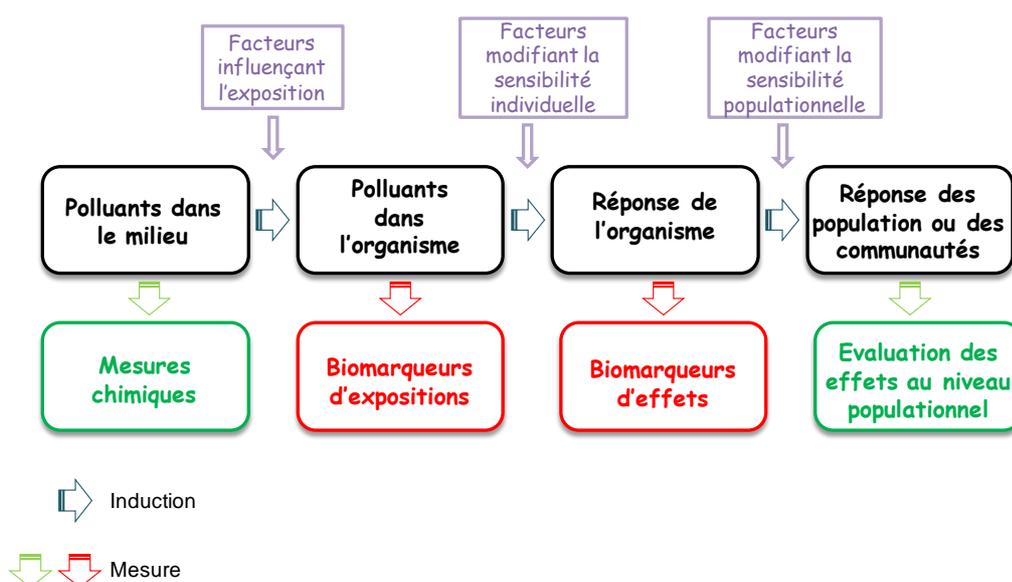


Figure 18 : Représentation des méthodologies faisant appel à l'utilisation des biomarqueurs dans l'évaluation des risques écotoxicologiques (Lagadic et al, 2007).

Les biomarqueurs sont généralement classés en 2 groupes (NRC, 1987 ; NAS/NRC, 1989 ; WHO, 1993 ; figure 18 ; tableau 16):

- les biomarqueurs d'exposition à un xénobiotiques,
- et les biomarqueurs d'effets de l'exposition

La première catégorie de biomarqueurs indique que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme. Généralement, les biomarqueurs d'exposition sont le résultat d'une interaction entre le xénobiotique et des molécules biologiques présentes dans les tissus ou les fluides de l'organisme.

Tableau 16 : Principaux biomarqueurs selon d'OSPAR (d'après Vasseur et Cossu-Leguillee, 2003).

	Biomarqueurs	Commentaires	Effets	Substances chimiques
Biomarqueurs d'exposition	CYP 1A1, expression et activité EROD, BaP hydroxylase, Glutathion-S-transférase	Les activités monooxygénases impliquant diverses isoformes de cytochromes P450 (la mesure la plus connue est l'induction de l'activité enzymatique EROD) sont impliquées dans le métabolisme des composés endogènes lipophiles, et sont inductibles par des substances exogènes.	Induction	Pesticides organochlorés, PCBs, dioxines, HAPs, BaP, non spécifique
	Protéines multi, xénobiotique, résistance (MXR)	Les protéines de transport membranaire (système MXR/MDR) peuvent être induites ou inhibées par diverses substances organiques. C'est un mécanisme de défense cellulaire qui permet à la cellule transporter des métabolites ou des xénobiotiques.	Induction/ inhibition	Substances organiques (HAPs, PCBs et métabolites...)
	Acétyl cholinestérase	Activité enzymatique du métabolisme de neurotransmetteurs.	Inhibition	Pesticides (organo-phosphorés, carbamates)
	Vitellogénine	Protéines de réserves des œufs synthétisés dans le foie.	Induction (mâle)	Perturbateurs endocriniens
	Métallothionéines/ phytochélatines, protéines de stress	Les métallothionéines (MTs) et phytochélatines (PCs) normalement exprimées dans les tissus, impliquées dans l'homéostasie des métaux, peuvent être surexprimées en présence de métaux, mais aussi de composés organiques aromatiques inducteurs de stress oxydatif cellulaire.	Induction	Métaux, autres xénobiotiques
	Dommage ADN, adduits ADN	Les polluants (HAPs, organiques persistants...), comme des facteurs physiques, peuvent altérer de différentes façons l'intégrité de la structure de l'ADN (cassure simple et double brin, liaison ADN, dommages chromosomiques), soit directement soit <i>via</i> leurs métabolites.	Occurrence	Mutagènes, génotoxiques
Biomarqueurs d'effet	Dommage ADN		Occurrence	Mutagènes, génotoxiques ?
	Acétyl cholinestérase		Inhibition	Pesticides (organo-phosphorés, carbamates)
	Peroxydation lipidique	Des polluants peuvent augmenter les niveaux cellulaires de molécules oxygénées fortement réactives (ROS), soit par une induction de synthèse soit par une inhibition des mécanismes de défense. Lorsque ces derniers sont débordés les lipides membranaires, les protéines cellulaires sont endommagées par des réactions de peroxydation. Ces processus peuvent être mesurés et utilisés comme indicateurs de stress.	Induction	Non spécifiques
	Enzymes antioxydantes		Induction/ inhibition	
Intégrité lysosomiale	La stabilité de la membrane semi-perméable des lysosomes est un indicateur de l'état de la cellule.	Diminution		

La seconde catégorie de biomarqueurs indique que le xénobiotique qui a pénétré dans l'organisme, a exercé un effet toxique sur ce dernier. L'approche utilisant des biomarqueurs a été initialement développée afin d'évaluer les réponses d'un individu à une exposition à un xénobiotique ou à un stress. Partant de ce constat, certains auteurs sont partis du postulat que le terme biomarqueur n'était qu'une dénomination de composants ou processus préexistants dans l'organisme. L'utilisation de biomarqueurs nécessite donc de connaître au préalable le fonctionnement des êtres vivants. Depledge (1994) propose une analyse du rôle fonctionnel des biomarqueurs par rapport à l'état d'homéostasie de l'organisme (figure 19). Les biomarqueurs permettent donc le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Toutefois, lorsque la dose de xénobiotiques augmente, certains biomarqueurs interviennent pour compenser l'action des contaminants. D'autres biomarqueurs ne compensent pas l'action des xénobiotiques mais la subissent, et font partie des biomarqueurs de non-compensation. Si la dose ou l'exposition augmente encore, l'état de santé de l'individu devient alors irréversible, aboutissant généralement à la mort de l'individu.

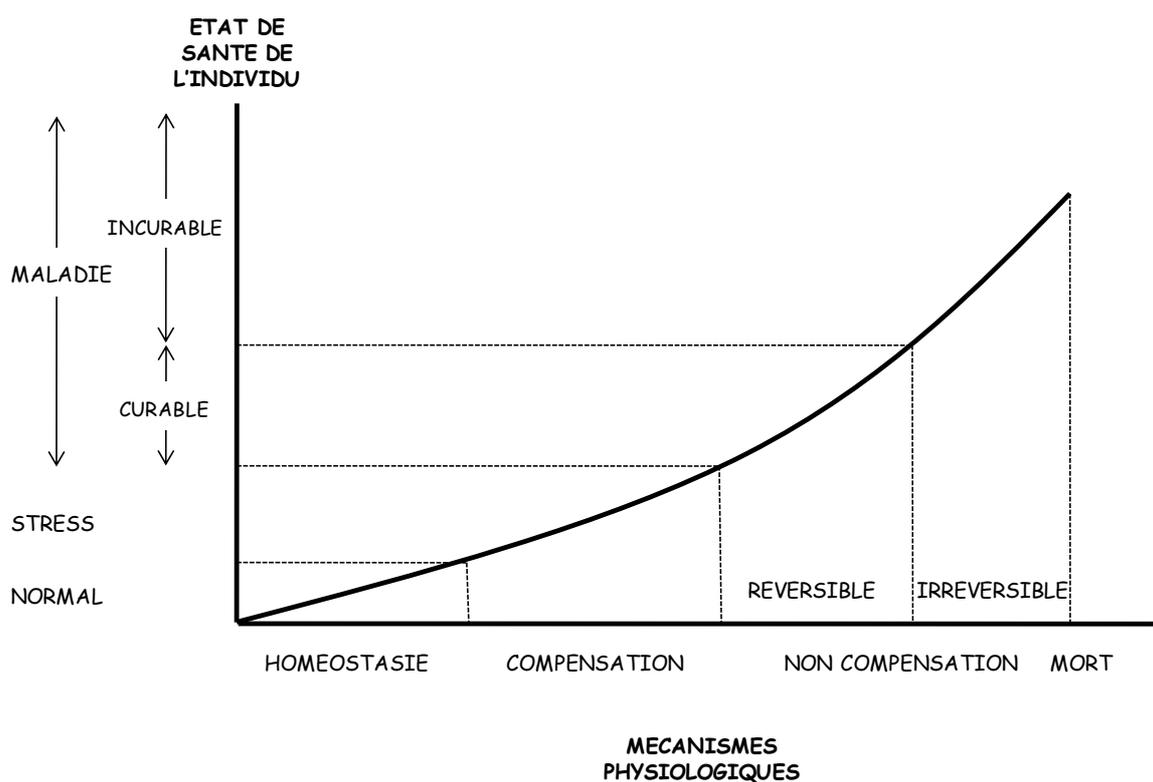


Figure 19 : Représentation schématique de l'évolution du rôle des biomarqueurs en fonction de la concentration en toxique ou de la durée d'exposition (d'après Depledge, 1994).

Les biomarqueurs offrent donc un potentiel intéressant pour évaluer la qualité environnementale. Les qualités d'un biomarqueur doivent être la sensibilité et la spécificité. Toutefois, un nombre limité de biomarqueurs efficaces a été validé jusqu'à présent et la question posée reste de savoir comment interpréter les informations fournies par ces biomarqueurs. En effet, l'analyse du risque chimique sur les écosystèmes doit prendre en compte des combinaisons variées entre les différents facteurs de stress environnementaux (Moore et al, 2004) tels que les facteurs naturels (pH, salinité, température...) et les facteurs d'origine anthropiques (contamination, aménagement du territoire, surpêche...) (figure 20). A cet effet, des mesures doivent être prises pour évaluer la robustesse des biomarqueurs dans l'optique de valider leur utilisation dans des programmes d'analyse du risque environnemental. Pour cela, Stegeman et al (1992) ont précisé 6 critères de décision :

- les protocoles d'utilisation des biomarqueurs doivent être peu chers, facilement utilisables et en accord avec les normes d'assurance qualité,
- la réponse du biomarqueur doit être sensible à une exposition/un effet du contaminant,
- les niveaux de base des biomarqueurs doivent être bien définis pour pouvoir faire la différence entre une variabilité naturelle et une variation induite par un stress,

- les impacts dus à plusieurs facteurs de stress doivent être bien établis,
- les relations entre la réponse du biomarqueur et l'exposition à un contaminant (temps et dose) doivent être connues,
- la significativité de la relation entre la réponse biologique à long terme et l'impact sur l'organisme doit être établie.

Enfin, l'utilisation d'une batterie de biomarqueurs significativement représentatifs d'une exposition ou d'effets sur une/des espèces(s) sentinelle(s) appropriée(s) est recommandée dans les programmes d'évaluation du risque environnemental (Jemec et al, 2010).

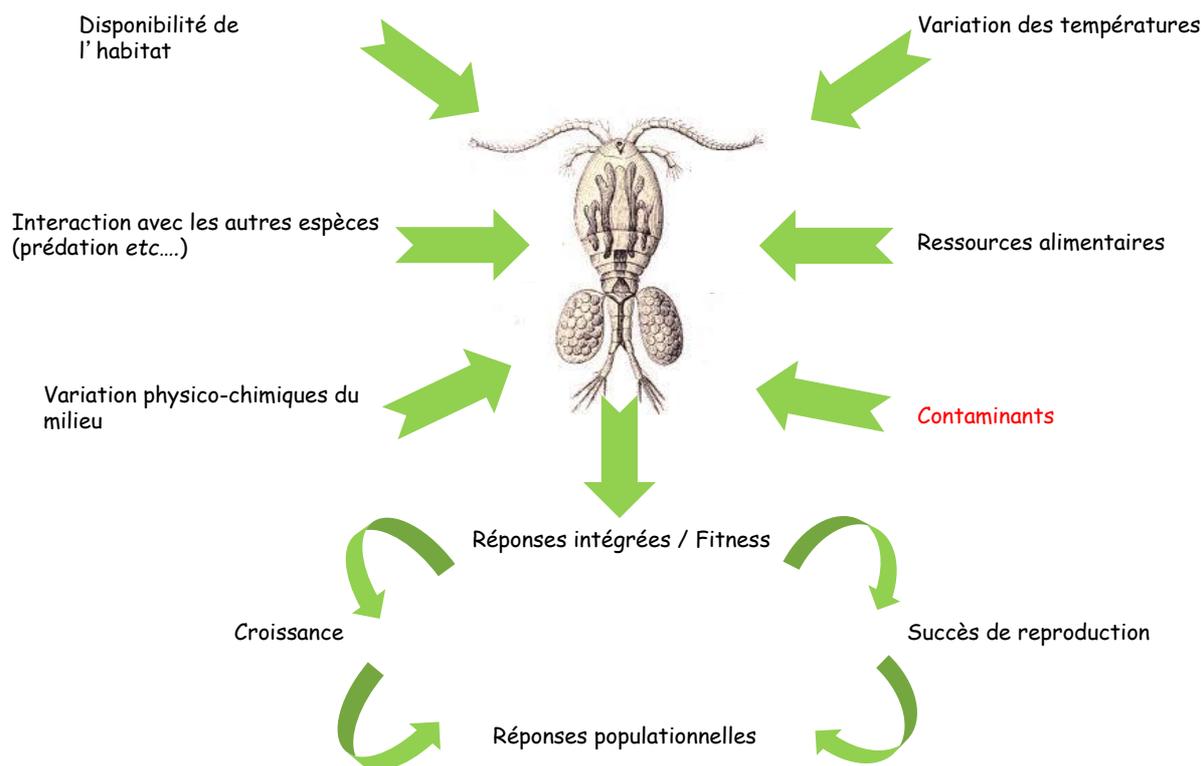


Figure 20 : Représentation des différents facteurs pouvant affecter la mesure d'un biomarqueur.

6.2.2. Chitobiase

Le système endocrinien chez les vertébrés est très bien connu. Depuis plusieurs années maintenant, les investigations sur le système endocrinien chez les invertébrés se multiplient, notamment depuis la découverte de polluants capable d'interagir avec ce système, les perturbateurs endocriniens (PE). Le système endocrinien chez les crustacés est un système complexe dans lequel de multiples acteurs prennent part (figure 21). Le système endocrinien permet notamment la croissance chez les crustacés et les changements de stade. La croissance chez les crustacés est précédée de la mue, sous le contrôle notamment d'une enzyme : la chitobiase.

La croissance et le développement chez les crustacés sont dépendants du processus de mue. La mue - sous contrôle hormonal - est un processus cyclique qui aboutit à l'exuviation. Les hormones clés chez les arthropodes - de nature stéroïde - sont appelées écdystéroïdes (Smagghe, 2009 ; Mykles, 2011). Chez les décapodes, l'hormone de mue - l'ecdysone - est produite dans

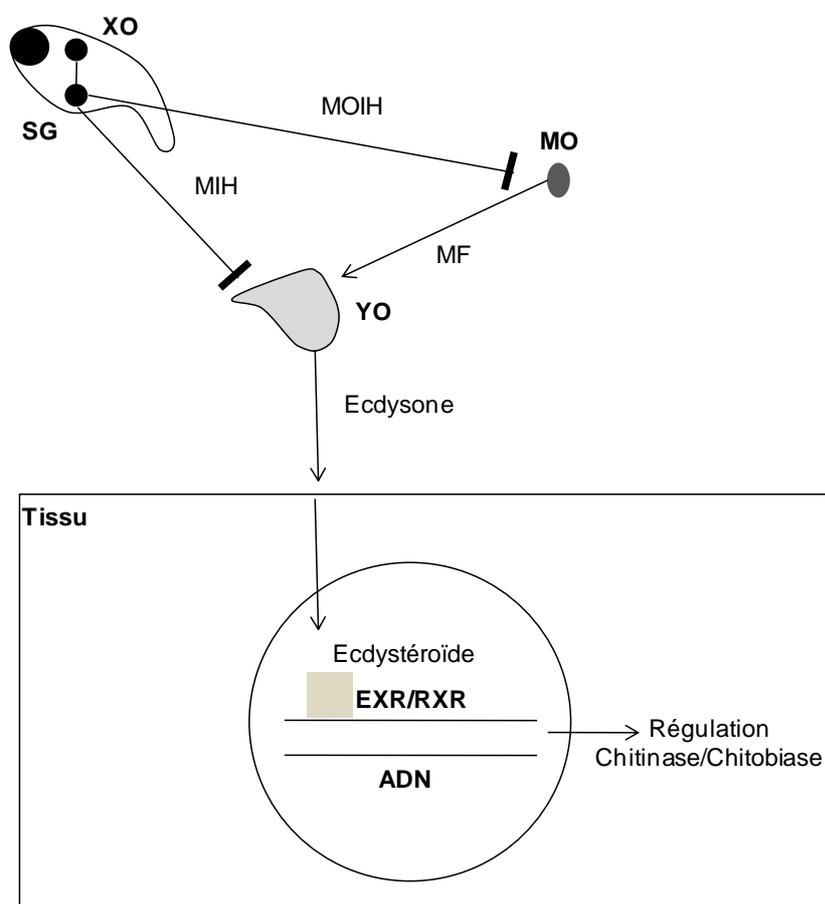


Figure 21 : Voie de synthèse de la chitobiase chez les crustacés (XO = Organe X, YO = organe Y, MF = methylfarnéosate, MO= Organe Mandibulaire MOIH = Mandibular organ-inhibiting hormone MIH= Molt inhibiting Hormone, SG= Glande du sinus, EXR/RXR =récepteur aux écdystéroïdes).

l'organe Y (YO, glande de mue ; figure 20). Pendant l'inter-mue, la synthèse d'ecdysone est principalement inhibée par la Molt-Inhibiting Hormone (MIH) produite par l'organe X (XO) des pédoncules oculaires (Nakatsuji et al, 2009 ; Chang & Mykles, 2011). Lorsque l'animal entre dans le stade de pré-mue, l'action de la MIH est stoppée, permettant l'ecdystéroïdogénèse. Les edystéroïdes- plus particulièrement la forme active de l'ecdysone, la 20-hydroxyecdysone (20-HE) - ont une action de régulation des gènes. En effet, leur fixation sur l'hétérodimère EcR/USP (EcR, récepteur aux ecdystéroïdes ; USP, ultraspiracle) entraîne sa translocation et sa fixation sur les éléments de réponse spécifiques EcREs (Ecdysone Response Elements) de gènes cibles dont il régule la transcription tels que les gènes codant la chitinase et la chitobiase (Nakagawa & Henrich, 2009). L'initiation de la mue est marquée par le détachement de l'épiderme à partir de l'ancienne cuticule de chitine, un processus nommé apolyse qui se produit lorsque l'animal entre dans le stade de pré-mue. La digestion de l'ancienne cuticule de chitine est réalisée via le fluide apolytique dans l'espace apolytique. Le fluide est sécrété par l'épiderme et contient deux enzymes (protéinases) majeures responsables de la digestion de l'ancienne cuticule, la chitinase et la chitobiase (Stevenson, 1985 ; Samuel & Reynolds, 1993 ; Espie & Roff, 1995).

La chitine est un des constituant majeurs de l'exosquelette ; c'est un polymère principalement constitué de N-acétylglucosamine (NAG ; Nagasawa, 2012). L'action conjointe d'enzymes chitinolytiques *i.e.* chitinase et chitobiase (N-acétyl-glucosaminidases) permet la digestion de la chitine. En premier lieu, la chitinase dégrade la chitine en oligomères de NAGs (Zou & Bonvillain, 2004) qui sont ensuite dégradés en monomères au travers de l'action de chitobiasés (Muzzarelli, 1977 ; Merzendorfer & Zimoch, 2003 ; Espie & Roff, 1995).

La chitobiase constitue un bon marqueur pour rendre compte de l'action des hormones stéroïdes dans le processus de mue (Zou & Fingerman, 1999b). L'activité chitobiase est localisée dans l'hépatopancréas des arthropodes et l'épiderme (Spinder-Barth et al, 1990 ; Zou & Fingerman, 1999a). Toutefois, durant l'exuviation, le fluide de mue, contenant les enzymes chitinolytiques, est libéré dans l'environnement aqueux rendant le dosage de la chitobiase non invasif. De par son importance dans le cycle de mue chez les crustacés, la chitobiase est employée dans l'étude des pollutions aquatiques (Zou & Fingerman, 1999a,b ; Hanson & Lagadic, 2005 ; Richards et al, 2008). Notamment, Duchet et al (2011) ont mis en évidence lors d'exposition de *Daphnia magna* et *Daphnia pulex* au Spinosad et au Diflubenzuron que l'activité chitobiase était un bon marqueur de survie, de développement et de reproduction. D'autres pesticides semblent inhiber l'activité chitobiase. En effet, Zou & Fingerman (1999a) ont montré que l'endosulfan ralentissait le processus de mue chez *Daphnia magna*. D'autres auteurs ont travaillé sur les retardateurs de flammes. Plus particulièrement, Girmondi & Thomé (2014) ont rapporté l'action inhibitrice de

deux PBDE (PBDE 47 et 99) chez *Gammarus pulex*. Des études ont été également menées sur les PCBs. Ainsi, Fingerman & Fingerman (1997) ont rapporté que l'Aroclor 1242 ralentissait le processus de mue chez le crabe *Uca pugilator*. Zou & Fingerman (1997b) ont également démontré que l'Aroclor 1242 et le PCB 29 causaient un retard du processus de mue chez *Homarus americanus*. De même, Zou & Fingerman (1999c) ont rapporté l'inhibition de l'activité chitobiase par le PCB 29 et l'octylphenol chez le crabe *Uca pugilator*.

CHAPITRE 2 :

MATERIEL ET METHODES

Savoir s'étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte (Louis Pasteur)

1. Sites de prélèvement / Stratégie d'échantillonnage

1.1. Prélèvement du copépode *Eurytemora affinis*

Les copépodes *Eurytemora affinis* ont été prélevés dans la zone oligo-mésohaline de l'estuaire de Seine. Les prélèvements ont eu lieu sur le site de Tancarville à proximité du pont à partir de pontons (49°28'19.24"/ 0°27'55.303") (figure 22). Pour les analyses bactériennes, les copépodes ont été prélevés au cours de 4 campagnes (COBAC 1, COBAC 2, COBAC 3 et COBAC 4) dont les modalités sont recensées dans le tableau 17. Les échantillonnages ont été effectués en réalisant plusieurs traits horizontaux (sub-surface) de filets WP2 (1m de diamètre, maille 200 µm) d'une durée de 5 à 10 min contre le courant, pendant le jusant, juste après l'étalement de haute mer. Immédiatement après l'échantillonnage, les copépodes sont triés sur place à l'aide de deux tamis de maillages différents *i.e.* 500 et 100 µm, le premier permettant d'éliminer les grosses particules et les prédateurs du genre *Gammaridae* ou *Mysidacea*, et le second permettant de conserver uniquement les individus *E. affinis* adultes. Les copépodes sont ensuite transférés dans une glacière isotherme contenant de l'eau de Seine afin d'être ramenés et triés au laboratoire à une température de 15 °C.

1.2. Prélèvement de l'eau pour les analyses microbiologiques et la détermination des paramètres physicochimiques (température, salinité)

Lors des campagnes COBAC, des prélèvements d'eau ont été effectués à 2 mètres de profondeur à l'aide d'une bouteille Niskin, à partir des pontons de Tancarville (figure 23). Les paramètres physico-chimiques des prélèvements sont répertoriés dans le tableau 17.

Au laboratoire, les containers isothermes sont placés dans une chambre thermostatée à 15°C sous une source lumineuse (915 Lumen) pendant 15 min, afin d'attirer les organismes à la surface par phototropisme positif (figure 24). Les organismes sont ainsi séparés grossièrement, des matières en suspension (MES). La phase supérieure du prélèvement d'eau était ensuite transférée dans des béciers de 5 L préalablement remplis pour moitié d'eau de mer filtrée traitée.



Figure 22 : Photographie satellite du site de prélèvement des organismes à Tancarville (Estuaire de Seine, France).



Figure 23 : Prélèvement d'eau de l'estuaire de Seine à l'aide d'une bouteille Niskin (Crédit photo, laboratoire M2C).

Tableau 17 : Paramètres abiotiques mesurés lors des prélèvements pour l'analyse du microbiote du copépe de *E. affinis* en estuaire de Seine.

	Campagnes				
	COBAC 1	COBAC 2	COBAC 3	COBAC 4	COBAC 5
	mars-11	mai-11	févr-12	mars-13	mars-14
Coordonnées	49°N26'18.9", 0°E19'25.0"	49°N26'205.0°E19'25.0"	49°N26'205.0°E19'.79	49°N26'18.9", 0°E19'25.0"	49°N26'18.9", 0°E19'25.0"
Horaires	Basse mer	2h20 après le pic de marée			
Températures	8,33	8	6,9	NA	NA
Salinité	6,1	6	1,3	NA	NA

Cette eau, issue de l'exploitation aquacole Aquacaux, Octeville-sur-Mer, France, a été filtrée (0,33 μm), traitée aux UV et ajustée à une salinité de 15 avec de l'eau distillée. Après une deuxième étape de 15 min de décantation sous une source lumineuse (915 Lumen), les phases supérieures sont de nouveau transférées dans des béciers de 5 L contenant pour moitié de l'eau de mer filtrée traitée. Selon la turbidité du prélèvement, cette étape est répétée plusieurs fois (3-6 fois) jusqu'à obtenir des échantillons sans MES. Les copépodes sont récupérés après un passage sur un tamis de plastique fin puis transférés dans des aquariums de 60 L d'eau de mer filtrée traitée. Afin d'optimiser la survie des copépodes, ces aquariums étaient sous oxygénation (bulleur électrique) 2 jours avant les prélèvements.

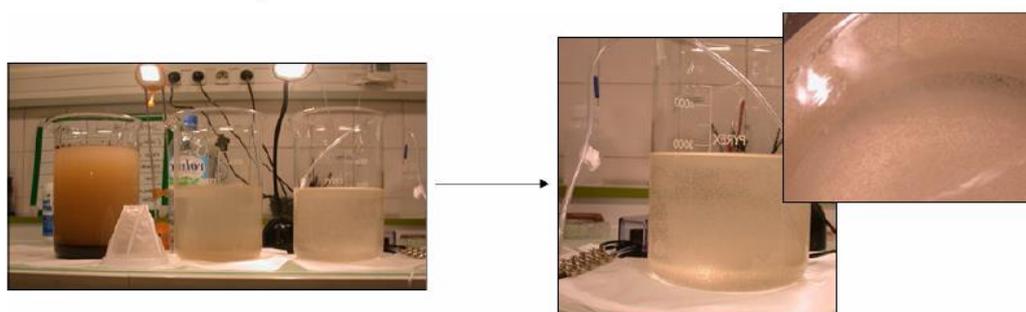


Figure 24 : Séparation des copépodes *E. affinis* de la matière en suspension (MES) au laboratoire (photos Cailleaud, 2006).

1.3. Collecte des sédiments

Les sédiments ont été collectés sur différents sites allant de l'aval à l'amont le long de l'estuaire de Seine : (1) Pont de Normandie, (2) Quillebeuf sur Seine, (3) Caudebec en Caux, (4) La Bouille, (5) Oissel, (6) Poses, plus un site de référence Yville-sur-Seine. Les sédiments ont été prélevés en période de crue (en février et décembre 2009) et en période d'étiage (en août et mai 2009), dans le but d'évaluer l'impact des conditions hydrologiques sur la contamination résiduelle des sédiments (figure 25). En pratique, les sédiments ont été collectés en surface (*i.e* zone oxiq) à l'aide de cuillères en aluminium préalablement pyrolysées (500°C) puis conditionnés dans des barquettes en aluminium recouvertes de cartons. Les échantillons ont été ramenés au laboratoire au plus tard 6 heures après le prélèvement et conservés à -80 °C en attendant leur traitement. Le sédiment de référence non contaminé provenait d'une gravière désaffectée localisée à Yville-sur-Seine (Cachot et al, 2006 ; 2007).

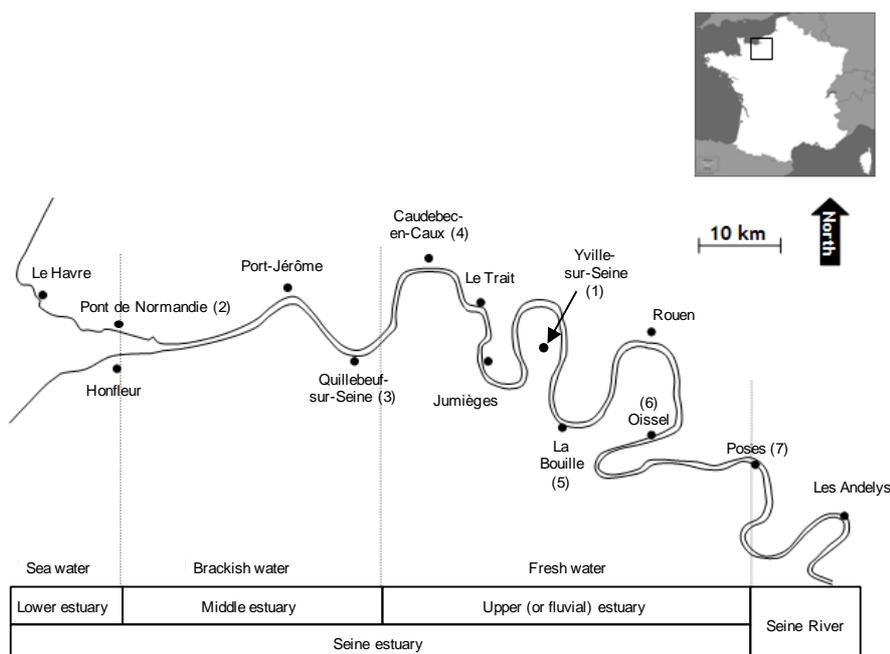


Figure 25 : Localisation des sites de prélèvement des sédiments (encadrés) en estuaire de Seine (France ; Deloffre. J).

2. Maintien au laboratoire des copépodes

2.1. Culture des copépodes

2.1.1. Acclimatation-stabulation

Les copépodes sont maintenus en conditions contrôlées sous oxygénation dans des aquariums de 60 L au laboratoire dans une chambre thermostatée, dans des conditions optimales pour le développement et la survie du copépode *E. affinis* i.e .15 °C, salinité 15, alternance jour: nuit 12h:12h (Devreker et al, 2007) jusqu'à l'obtention de nombreuses femelles ovigères. Les copépodes étaient alimentés tous les jours avec l'algue *Rhodomonas Salina* et/ou *Tahiti Isochrysis* à raison de 15 000 cellules.mL⁻¹ (cf paragraphe 2.2).

2.1.2. Production de nouvelles générations de copépodes

Dès l'obtention de femelles ovigères, 60 d'entre elles étaient isolées à l'aide d'une pipette pasteur en verre et déposées dans deux pondoirs (maillage de 33 µm) en partie immergés dans un nouvel aquarium de 20 L. Après la ponte (soit 48h environ), les femelles non gravides étaient transférées de nouveau dans les aquariums réservés à la stabulation des organismes. Les aquariums de 20 L (contenant une nouvelle génération de copépodes) étaient maintenus en chambre thermostatée en conditions contrôlées (oxygénation, 15°C, salinité 15, jour: nuit 12h:12h) et alimentés tous les jours avec l'algue *R. Salina* (15 000

cellules/mL). Après une vingtaine de jours *i.e.* la durée de développement jusqu'à l'âge adulte, les femelles ovigères étaient à leur tour isolées et utilisées pour réaliser les expérimentations au laboratoire (figure 26).

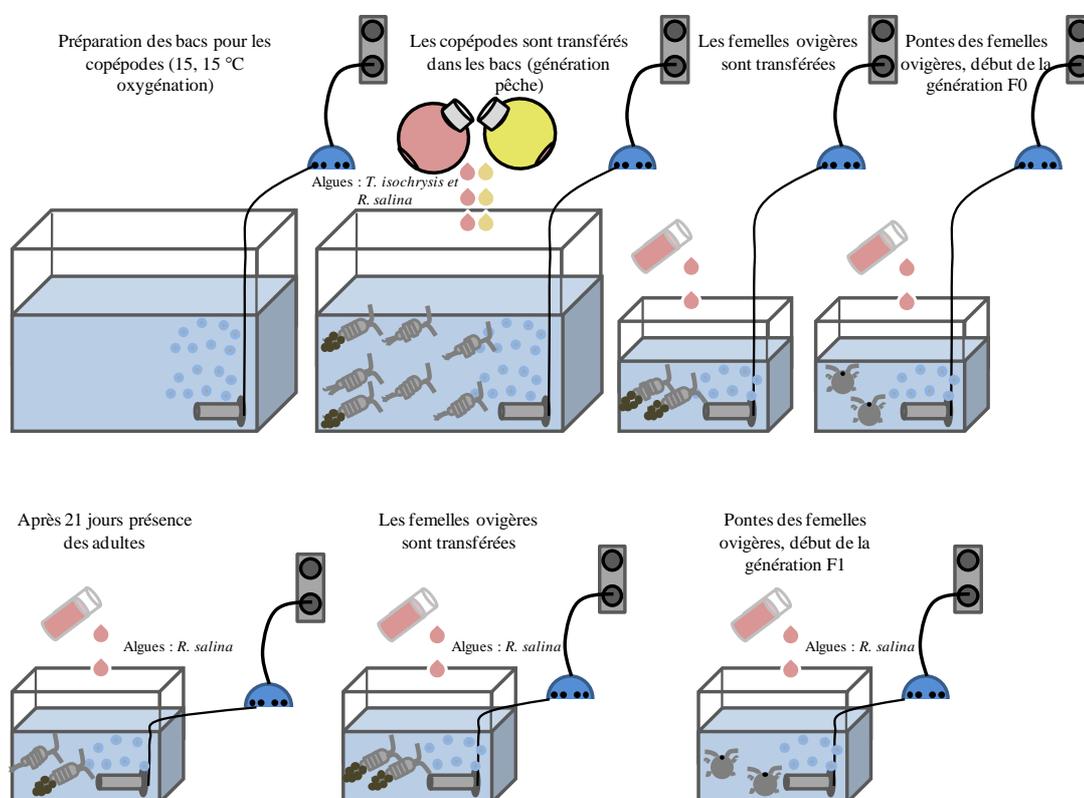


Figure 26 : Production d'une génération F1 de copépodes *E. affinis* au laboratoire.

2.2 Culture d'Algues

Le maintien d'une culture de copépodes a nécessité la mise en place au laboratoire d'une culture d'algues pour assurer leur nourrissage. Les souches d'algues provenaient de l'exploitation aquacole d'Aquacaux (Octeville-sur-Mer, France) ou de la station marine de Wimereux (France). Les souches de *R. salina* et de *T. Isochrysis* étaient maintenues dans des tubes à essai de 20 mL contenant de l'eau de mer enrichie (*i.e.* milieu de Conway, 10 mL et vitamine B 12, 1 mL ; annexe 1.2) préalablement filtrée et traitée aux UV.

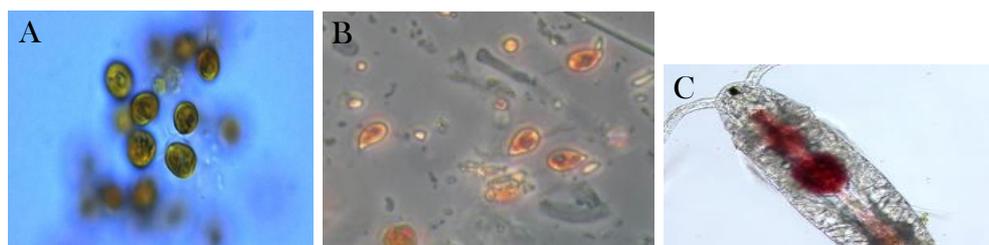


Figure 27 : Culture d'algues pour le nourrissage des copépodes *E. affinis*. (A) Observation microscopique de l'algue *Tahiti Isochrysis*. (B) Observation microscopique de l'algue *Rhodomonas salina*. (C) Observation stéréomicroscopique d'un copépode *E. affinis* après nourrissage. L'algue *R. salina* peut-être observée dans le tube digestif du copépode (www.ifremer.fr, www.novia.fi).

La culture d'algues était réalisée en conditions contrôlées *i.e.* 20-22°C, alternance jour: nuit 12h: 12h sous oxygénation, dans une pièce dédiée.

Les souches étaient maintenues au laboratoire dans des éprouvettes à l'abri de la lumière. Elles étaient utilisées pour ensemercer les cultures.

L'ensemencement était réalisé dans des ballons de 1L en ajoutant 10 mL de souche à 900 mL d'eau de mer (filtrée, traitée aux UV et autoclavée) supplémentée de 20 µL de milieu de Conway et de 2 µL de vitamine B 12. En parallèle, les éprouvettes contenant les souches d'algues étaient complétées à 20 mL avec de l'eau de mer (filtrée traitée sous UV) enrichie. Après quelques jours, lorsque la coloration des cultures était jugée suffisante (verte ou rouge selon la souche algale), les cultures (700 mL) étaient utilisées pour ensemercer des bombonnes de 10 L contenant 9 L d'eau filtrée traitée aux UV, 2 mL de milieu de Conway et 200 µL de vitamines B 12. Ces opérations étaient répétées chaque semaine pendant toute la durée de l'élevage des copépodes (figures 27, 28 et 29).

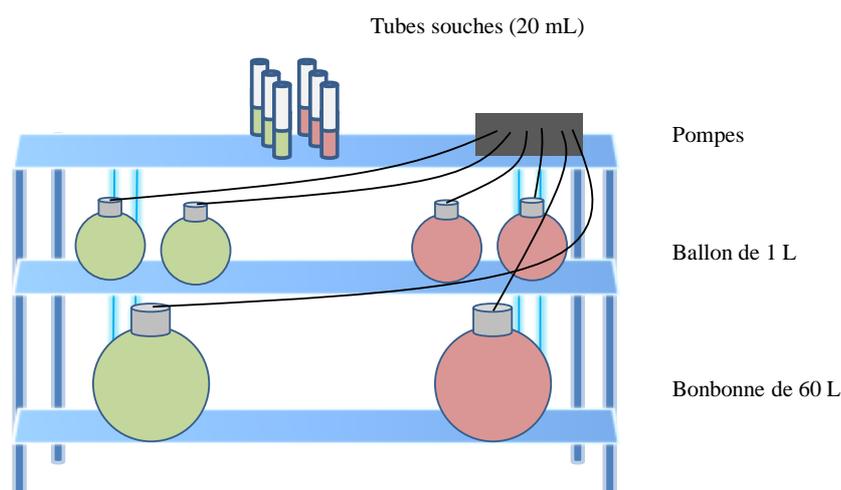


Figure 28 : Dispositif mis en place au laboratoire pour la culture des algues *T.Isochrysis* et *R. salina*.

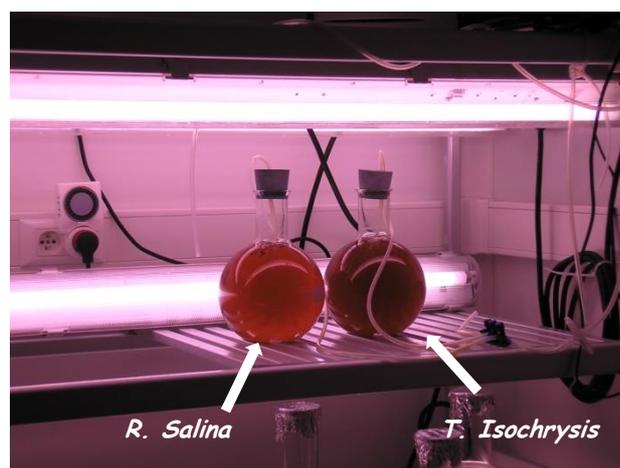


Figure 29 : Culture des algues *R. Salina* et *T. Isochrysis* en ballons.

3. Enrobage et caractérisation chimique des sédiments

3.1. Enrobage du sédiment de référence par des composés chimiques modèles

Les composés sélectionnés sont des représentants des familles de contaminants emblématiques de l'estuaire de Seine, choisis pour leur pertinence écotoxicologique.

Pour les HAPs, les composés étudiés étaient :

- le benzo(a)pyrène (BaP), connu pour sa toxicité chez les crustacés et notamment son effet sur le développement observé chez les nauplii du copépode *E. affinis* (Forget-Leray et al, 2005),
- le diméthylbenzoantracène (DMBA), toxique mais absent à l'état naturel dans l'estuaire de Seine,
- le phénanthrène (PHE), connu pour ses propriétés de perturbateur endocrinien chez les crustacés.

Pour les PCBs, un composé de chaque sous-famille (coplanaires ou non) a été retenu : le PCB 126 (PCB-DL, coplaire) et le PCB 153 (PCB-NDL, globulaire, très persistant dans l'environnement).

Enfin, concernant les APs, le 4-nonylphénol (4-NP) a été choisi ; il constitue la forme la plus commune dans l'environnement et la plus étudiée. Le 4-NP est un perturbateur endocrinien ayant un effet reprotoxique chez les crustacés aquatiques (Zou & Fingerman, 1999 a et b).

Avant enrobage, le sédiment de référence (Yville-sur-Seine) a été lyophilisé puis broyé à l'aide d'un mortier afin de faciliter la capacité de sorption des sédiments. L'analyse de la taille des particules a été effectuée par diffractométrie aux rayons X (Vicquelin, 2012). Les sédiments ont été conservés dans des flacons en verre ambré à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à l'enrobage.

L'enrobage du sédiment a été effectué à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapor®, Buchi). En pratique, une solution de dichlorométhane a été ajoutée au sédiment placé préalablement dans le ballon de l'évaporateur à raison de 20 mL par gramme de sédiment. La solution de contaminant (dilué dans l'isooctane) a ensuite été ajoutée à raison de 20 µL par gramme de sédiment. L'évaporation du dichlorométhane - au cours de laquelle l'adsorption du polluant aux grains de sédiment a lieu - a été réalisée par mise en rotation du ballon dans un bain marie chauffé à 45 °C (la température d'ébullition du dichlorométhane étant d'environ 40 °C). La manipulation a été poursuivie jusqu'à évaporation complète du solvant. Les sédiments enrobés ont ensuite été aliquotés dans des flacons en verre ambré de 10 ml à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à utilisation.

3.2. Caractérisation chimique des sédiments

L'ensemble de la procédure de caractérisation chimique (extraction et analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) a été effectué par l'Equipe « Contaminants organiques » du laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'Environnement (LPTC) de l'UMR 5805 EPOC de l'Université de Bordeaux 1 (Equipe d'Hélène Budzinski).

3.2.1. Sédiments de référence dopés

Le sédiment d'Yville-sur-Seine servant de référence est très faiblement contaminé en HAPs, PCBs et NPs (de l'ordre du ng.g⁻¹ de sédiment sec ; Cachot et al, 2006; Cachot et al, 2007). La qualité de l'enrobage était variable selon la nature du composé, globalement meilleure pour le 4-NP et le PCB153 que pour le DMBA et le PCB126. Toutefois, l'enrobage permet d'obtenir un gradient de concentrations incluant les doses environnementales (X) (tableau 18 ; cf paragraphe 3.1.1.1).

Tableau 18 : Concentrations nominales et concentrations mesurées exprimées en ng.g⁻¹ de sédiment sec. X représente la concentration environnementale.

Compounds	Nominal concentration	Theoretical concentration (ng.g ⁻¹ dws)	Measured concentration (ng.g ⁻¹ dws)	Coating efficiency (%)
PAHs				
<i>BaP</i>	0X	0.0	0.0	-
	0.5X	250.0	65.0	26
	1X	500.0	142.0	28
	5X	2,500.0	818.0	33
	25X	12,500.0	5,381.5	43
	100X	50,000.0	22,395.5	45
<i>DMBA</i>	0X	0.0	<0.1	-
	0.5X	250.0	88.0	35
	1X	500.0	151.0	30
	5X	2,500.0	853.0	34
	25X	12,500.0	6,082.0	49
	100X	50,000.0	36,046.0	72
<i>PHE</i>	0X	0.0	0.0	-
	0.5X	250.0	12.0	5
	1X	500.0	297.0	59
	5X	2,500.0	1,398.0	55
	25X	12,500.0	6,502.0	52
	100X	50,000.0	58,541.0	117
PCBs				
<i>PCB 126</i>	0X	0.0	0.1	-
	0.5X	10.0	4.0	40
	1X	20.0	8.0	40
	5X	100.0	37.0	37
	25X	500.0	176.0	35
	100X	2,500.0	720.0	29
<i>PCB 153</i>	0X	0.0	0.8	-
	0.5X	10.0	6.0	60
	1X	20.0	12.0	60
	5X	100.0	80.0	80
	25X	500.0	341.0	68
	100X	2,500.0	1,350.0	54
AP <i>4-NP</i>	0X	0.0	55.0	-
	0.5X	250.0	136.0	54
	1X	500.0	482.0	98
	5X	2,500.0	1,225.0	49
	25X	12,500.0	8,453.0	68
	100X	50,000.0	33,349.0	68

3.2.2. Sédiments naturels

3.2.2.1 Extraction des composés hydrophobes

Après lyophilisation du sédiment, l'extraction des HAPs et PCBs- assistée par micro-ondes (10 min à 30 W) - a été réalisée dans le dichlorométhane (Budzinski et al, 2000). Les échantillons ont alors été filtrés puis purifiés deux fois à l'acide sulfurique dilué dans un champ de micro-ondes (10 min à 30 W) sous agitation magnétique. L'extrait organique a été neutralisé avec de l'eau déionisée, séché sur du sulfate de sodium anhydre et enfin reconcentré. Une seconde purification a été effectuée sur des micro-colonnes de silice contenant du cuivre activé pour éliminer le soufre élémentaire. Les HAPs et les PCBs ont

été élués simultanément dans un mélange pentane-dichlorométhane (ratio volumique 9:1). L'extrait a enfin été concentré dans l'isooctane et soumis à analyse. Des standards internes de PCBs et de HAPs ont été ajoutés afin de contrôler la qualité de cette dernière.

L'extraction du 4-NP- assistée par micro-ondes (10 min à 30 W) - a été réalisée à l'aide d'un mélange méthanol/dichlorométhane (ratio volumique 3:1). L'extrait a été filtré sur du coton de verre, puis concentré sous vide en chauffant à 80 °C pendant 15 min. L'extrait a, par la suite, été resuspendu dans une solution à pH 2 et purifié sur une cartouche C18 (Lardy-Fontan, 2008). Après élution, la cartouche a été nettoyée 3 fois avec un mélange isovolumique de méthanol et d'eau acidifiée (pH 2). La phase aqueuse a alors été éliminée par séchage de la cartouche pendant 1 h. Enfin, le 4-NP a été élué dans un mélange méthanol/dichlorométhane (ratio volumique 1:1) et reconcentré sous flux d'azote (Cailleaud et al, 2007b ; Vicquelin, 2011).

3.2.2.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse

Les composés hydrophobes étudiés ont été séparés par chromatographie en phase gazeuse. Les techniques de séparation par chromatographie s'appuient sur des équilibres de phase. Pour chaque composé, il existe un équilibre entre les molécules stationnaires, retenues, et les molécules se déplaçant avec un vecteur, ici gazeux, du fait de la capacité des composés à être vaporisés par chauffage et décomposition. L'extrait est placé dans un injecteur qui vaporise le mélange dans une colonne capillaire. Un gaz inerte, l'hélium, sert de vecteur le long du capillaire jusqu'à un détecteur. Chaque composé est caractérisé par un temps de rétention qui lui est propre. A la sortie du capillaire, le composé doit être quantifié et qualifié. Ceci se fait par un couplage à un spectrophotomètre de masse, donnant la masse molaire du composé parent. Les molécules sont ionisées dans la source du spectromètre de masse par bombardement électronique à 70 eV. Il en résulte un mélange d'ions caractéristiques de la molécule. Les ions sont ensuite accélérés dans un champ électrique et sont détectés. Suivant la charge et la taille des ions, le temps pour atteindre le détecteur ainsi que son point d'impact sera différent. Cette méthode permet de définir la structure de la molécule, sa masse molaire ainsi que sa concentration, les rendements étant déterminés par l'ajout de standards deutérés (Cailleaud, 2006).

4. Expérimentations

4.1. Le bio-essai « BASIC » (6 jours)

4.1.1. *Choix des concentrations en contaminants et des sédiments*

4.1.1.1. *Voie d'exposition particulière (sédiments de référence dopés et sédiments naturels)*

Pour les sédiments dopés, le choix a été fait d'évaluer l'impact d'une large gamme de concentrations de contaminants (BaP, DMBA, PHE, PCB 126, PCB 153 et 4-NP) allant des concentrations inférieures aux niveaux environnementaux en estuaire de Seine jusqu'à des niveaux très élevés en contaminants. Pour chaque composé, une concentration environnementale a été choisie en référence à sa concentration dans le sédiment en estuaire de Seine. Ainsi, des concentrations environnementales de 500 ng.g⁻¹, 40 ng.g⁻¹ et 500 ng.g⁻¹ ont été respectivement choisies pour les HAPs, les PCBs et le 4-NP. Par la suite, pour chaque composé, la gamme de concentration a été : 0X ; 0,5X ; 1X ; 5X ; 25X et 100X (avec X, la concentration environnementale).

Pour les sédiments naturels, les sites de prélèvements dans l'estuaire de Seine ont été choisis dans le cadre du projet TOXSEINE, et sont des sites surveillés par la communauté des chercheurs du programme Seine Aval.

4.1.1.2. *Voie d'exposition dissoute (eau contaminée)*

Pour les expositions par voie dissoute, les concentrations en contaminants (PCB 126, 4-NP) ont été choisies en fonction des concentrations de ces composés dans la colonne d'eau en estuaire de Seine (déterminées lors de précédentes études menées dans le cadre de Seine aval III).

La dose 1X équivalait à 200 ng/L pour le PCB 126 et à 1000 ng/L pour le 4-NP, avec X la concentration environnementale des composés. Les solutions mères de contaminants utilisées lors des expositions ont été préparées par l'équipe « Contaminants organiques » du laboratoire de Physico- et Toxico- et Toxico Chimie de l'Environnement (LPTC) de l'UMR 5805 (EPOC UMR5805) de l'Université de Bordeaux 1. Le solvant utilisé était l'acétone pour sa faible toxicité et pour ses propriétés de bonne miscibilité dans l'eau.

4.1.1.3. Expérience de colonisation

Les expériences d'exposition bactériennes ont été réalisées à partir d'une espèce de *Vibrio*, la souche m2c049, isolées de l'estuaire de Seine (campagne de février 2012) (Chaix, 2012). La souche *Vibrio* est utilisée sous agitation (24 H à 25°C). Le suivi de la croissance des *Vibrios* s'est fait par dénombrement sur milieu gélosé (TSA, 24h à 25°C) en triplicats. Les expériences d'exposition bactérienne ont été réalisées à deux densités différentes, une densité de 10^1 UFC.mL⁻¹, correspondant aux conditions environnementale, et une densité élevée de 10^6 UFC.mL⁻¹. Le milieu est réensemencé toutes les 48 H à raison d'une solution de 25 µL d'une suspension de *Vibrio* afin de maintenir un niveau de contamination permanent.

4.1.2. Principe et mise au point

4.1.2.1. Voie d'exposition particulière (sédiments de référence dopés)

Le principe du bio-essai BASIC est schématisé sur la figure 30. Ce bio-essai consiste à exposer des nauplii du copépode *E. affinis* pendant six jours (durée de la phase larvaire) à des contaminants par voie particulière (élutriats de sédiments dopés ou naturels).

Deux jours avant le début de l'exposition (J-2), des femelles ovigères (environ 120) sont individuellement isolées dans 3 mL d'eau de mer filtrée traitée aux UV de salinité 5, dans des microplaques 12 puits (Greiner Bio One). Parallèlement, 24h avant l'exposition, les élutriats de sédiments dopés ou naturels sont préparés à partir de 0,25 g de sédiments sous agitation une nuit dans 50 mL d'eau de salinité 5.

A J0, les nauplii issus des pontes sont placés dans un cristallisoir en verre contenant 5 mL d'eau de salinité 5. Dix nauplii par réplicat (3 réplicats par condition) sont isolés dans 10mL d'élutriat pour évaluer les effets des contaminants sur la mortalité et la croissance. Dans le même temps, des nauplii sont individuellement isolés dans des puits de microplaques (12 puits) contenant 3 mL d'élutriat de salinité 5 en vue du dosage de l'activité chitobiase. Les expositions sont réalisées pendant 6 jours dans les conditions contrôlées dans une enceinte thermostatée (15 °C ; salinité 5 ; cycle jour : nuit 12h :12h). Les nauplii sont alimentés les 1^{er} et 3^{ème} jours avec les algues *T.iso* (15 000 cellules. mL⁻¹).

Parallèlement, 50 nauplii étaient sacrifiés à J0 dans le but de déterminer leur taille initiale avant exposition.

4.1.2.2. Voie d'exposition particulaire (sédiments naturels)

Tout au long de ces travaux, les protocoles de cultures de copépodes et algales se sont développés et améliorés. C'est pourquoi, les paramètres abiotiques lors des expositions ont été adaptés. Lors des expositions aux sédiments naturels en provenance de l'estuaire de Seine, le principe général du bio-essai est resté inchangé (voir paragraphe 3.1.1.1). Cela étant, la salinité est passée à 15 et les nauplii ont été alimenté en algues *R. salina* au bout de trois jours d'exposition.

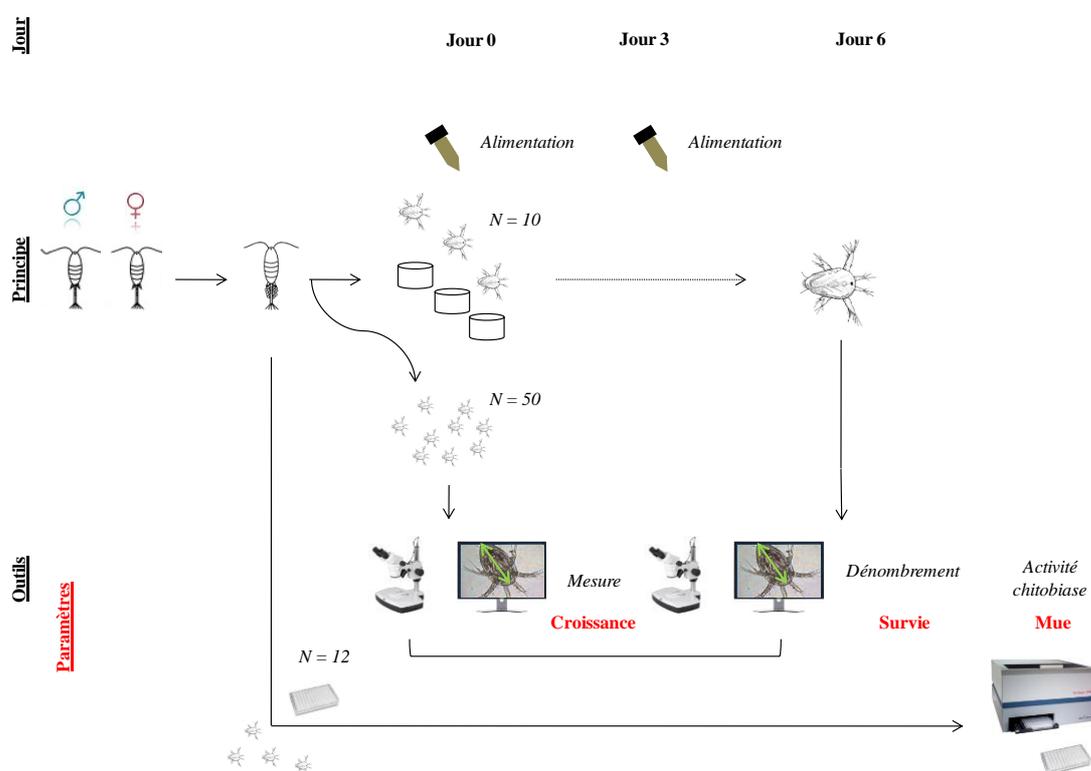


Figure 30 : Principe du bio-essai larvaire BASIC.

4.1.2.3. Voie d'exposition dissoute (eau contaminée et suspension bactérienne)

Le protocole du bio-essai BASIC a été adapté pour les expositions aux contaminants en solution et aux suspensions de *Vibrio* (souche m2c049). Il est réalisé en conditions semi-statiques (renouvellement du milieu d'exposition tous les 2 jours). Les nauplii sont alimentés après renouvellement du milieu d'exposition et les paramètres évalués tous les deux jours. Les copépodes sont maintenus dans des conditions contrôlées au laboratoire dans une chambre thermostatée (15 °C) ; salinité 15 ; rythme circadien 12h :12h).

La mesure de l'activité chitobiase a également été optimisée. En pratique, 20 nauplii (en duplicats) sont répartis à J0 dans des cristallisoirs en verre contenant 25 mL de solution de contaminant. Tous les 2 jours, le nombre de nauplii en vie est évalué, 10 mL du milieu de l'exposition sont prélevés juste avant le renouvellement du milieu pour dosage de la chitobiase. Cette méthode est répétée jusqu'au 6^{ème} jour d'exposition.

4.2. Bio-essai multigénérationnel

Les bio-essais multigénérationnels ont été effectuées à la station marine de Wimereux sous la direction du professeur Sami Souissi et Anissa Ben Radhia (LOG UMR 8187, université de Lille 1).

4.2.1. Choix des concentrations

Dans le cadre des expérimentations multigénérationnelles, le choix s'est porté sur des concentrations pertinentes en BaP, PCB 126 et 4-NP. Les organismes ont été contaminés à des concentrations environnementales (1X) durant 3 générations successives dans des conditions semi-statiques (tableau 19).

Tableau 19 : Contaminants et concentrations testées lors du bio-essai multigénérationnel avec *E. affinis*.

Composés	Dose d'exposition	Concentrations réelles	Concentrations environnementales
			(Cailleaud et al, 2007a et b)
BaP	1X	500 µg.L ⁻¹	262 ng.L ⁻¹
PCB 126	1X	200 µg.L ⁻¹	ND
4-NP	1X	1 µg.L ⁻¹	0,4-2,2 µg.L ⁻¹

4.2.2. Principe du bio-essai multigénérationnel (2 mois)

Les femelles ovigères étaient transférées dans des bacs de 40 L contenant de l'eau de mer ajustée à une salinité 15. Ces dernières étaient maintenues à 18 °C avec un rythme circadien 12h :12h dans une enceinte thermostatée (LMS cooled). Les femelles étaient alimentées avec l'algue *R. Salina* à raison de 15 000 cellules.mL⁻¹. Les nauplii collectés après la ponte (environ 2 jours après isolement des femelles ovigères) constituaient la génération F0. Cette étape a permis l'acclimatation des organismes (figure 31).

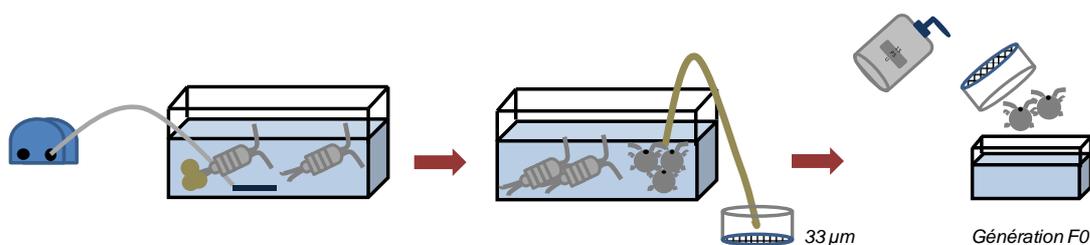


Figure 31 : Synchronisation des femelles *E. affinis* et obtention de la génération F0.

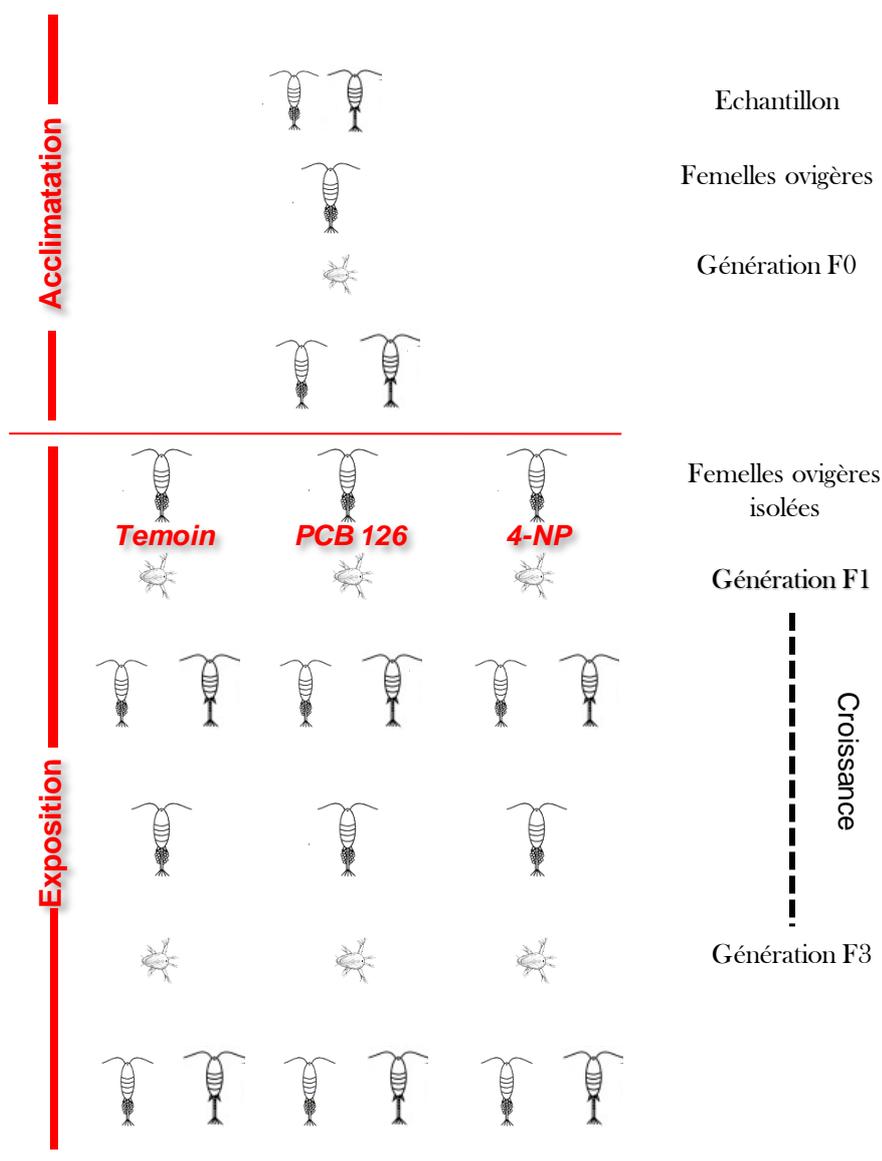


Figure 32 : Principe du bio-essai multi-générationnel.

Les nauplii (génération F0) étaient alimentés tous les jours avec *R. Salina* (15 000 cellules.mL⁻¹). Les nauplii étaient maintenus dans des conditions contrôlées au laboratoire

jusqu'à l'obtention de 40 nouvelles femelles ovigères (en duplica pour chaque condition d'exposition dans des pondoirs immergés dans des béciers de 2 L avec de l'eau de mer de salinité 15. Deux jours après, les nauplii (génération F1) étaient laissés dans les béciers de 2 L pendant que les 40 femelles étaient fixées dans 2 % de formol et conservées jusqu'à analyse. Ulérieure (taille, malformation, fécondité). Les nauplii de génération F1 étaient alors exposés en conditions contrôlées jusqu'à apparition de 40 nouvelles femelles ovigères. Les nauplii issus de la ponte de ces dernières correspondaient à la génération F2. L'opération a été reconduite de façon à disposer d'une génération F3. L'exposition étaient poursuivie jusqu'à obtention de la génération F3 (renouvellement figure 32). Ces dernières étaient isolées régulier de l'eau contaminée).

4.3. Marqueurs biologiques- Bio-essai BASIC

4.3.1. *Survie*

Les nauplii en vie ont été dénombrés après six jours de contamination pour les expositions par voie particulaire et tous les deux jours pour les expositions par voie dissoute à l'aide d'un stéréomicroscope (MZ75, Leica Microsystems).

4.3.2. *Croissance*

Au début de chaque expérimentation, 50 nauplii étaient collectés au hasard et fixés dans du formol 5% (échantillon contrôle). Au cours des expérimentations, les nauplii en vie étaient fixés dans le formol 5% soit à la fin de l'expérimentation pour la voie particulaire soit tous les deux jours pour la voie dissoute. La longueur du prosome de chaque nauplii fixé était mesurée à l'aide d'un stéréomicroscope (MZ75, Leica Microsystems) et du logiciel Leica LAS Analyse d'image afin d'évaluer la croissance, la taille des nauplii exposés était soustraite à la moyenne de la taille des 50 nauplii prélevés au début de l'expérimentation.

4.3.3. *Chitobiase*

Durant l'exuviation, le fluide de mue, contenant les enzymes chitinolytiques, est libéré dans l'environnement aqueux rendant le dosage de la chitobiase non invasif. La méthode de mesure de l'activité chitobiase chez les nauplii du copépode *E. affinis* a été adaptée de la méthode d'Espie et Roff (1985). En bref, cette méthode utilise le méthylumbélliféryl-N-

acétyl-glucosamine (MUF-NAG) comme substrat. Ce composé est clivé par la chitobiase en N-acétylglucosamine (NAG) et en méthylumbelliférone (MUF) qui fluoresce à pH basique (figure 32).

4.3.3.1. Principe du dosage de l'activité chitobiase (sédiments de référence dopés et naturel)

L'activité chitobiase a été mesurée immédiatement après les 6 jours d'exposition. La mesure de l'activité chitobiase a été réalisée selon la méthode d'Espie and Roff (1995) et modifiée par Sastri and Roff (2000) et par Hanson et Lagadic (2005). Cet essai utilise le MUF-NAG comme substrat qui est clivé par la chitobiase en NAG et le fluorescent MUF (4-méthylumbelliférone) (Figure 33). Dans le principe, les 3 mL du milieu d'exposition contenant les nauplii ont été filtrés au travers d'un filtre 0,2 µm pour enlever les bactéries et les algues. 150 µL de ce milieu a été mis à incuber dans une microplaque 96 puits (Greiner Bio-one) en présence de 50 µL de 0,31 mM de MUF-NAG et 0,15 M de tampon citrate à pH 5,5. La solution mère de MUF-NAG (5 mM) a été réalisée en dissolvant le MUF-NAG dans du méthyl cellosolve. La réaction a été stoppée au bout d'une heure d'incubation en ajoutant 0,25 N de NaOH et la fluorescence est mesurée à 360 nm excitation et 450 nm émission. La chitobiase est exprimée en Fluorescence par heure.

4.3.3.2. Principe de l'activité chitobiase (par voie dissoute)

Tout comme le bio-essai, le dosage de l'activité chitobiase a été amélioré dans le cadre des expositions par voie dissoute. En effet, dans le cadre des expositions par voie dissoute, 20 nauplii ont été isolés dans 25 mL de milieu, en duplicat pour les jours 2, 4 et 6. Tous les 2 jours pendant l'exposition, les cristallisoirs correspondant ont été récupérés, les nauplii sacrifiés et le milieu conservé dans un tube falcon de 50 mL et maintenu à 4 °C dans l'obscurité. Les mesures des niveaux d'activité chitobiase ont été réalisées à partir de ces aliquots par le même principe que pour la voie sédimentaire.

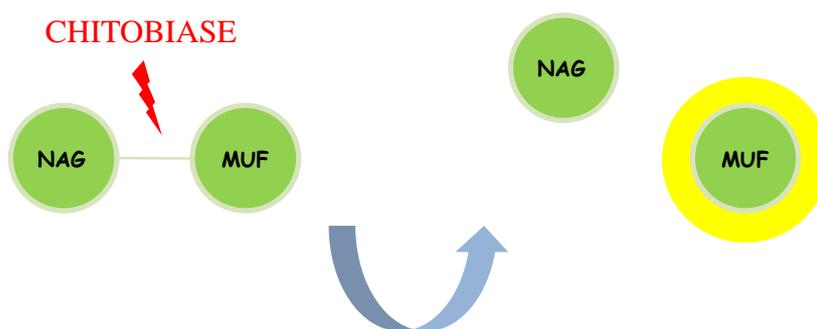


Figure 33 : Principe du dosage de l'activité chitobiase.

4.4. Marqueurs biologiques- Bio-essai multigénérationnel

4.4.1. Taille des individus

A l'exception des 40 femelles ovigères utilisées pour assurer le renouvellement de la génération de copépodes, la totalité des individus présents dans le béccher ont été fixés au formol 5 %, observés à l'aide d'un stéréomicroscope (M75) et photographiés. La taille des individus a été mesurée à l'aide du logiciel Image J à partir des photographies.

4.4.2. Stade de développement

L'observation des photographies a permis de déterminer le stade de développement de chaque individu sur la base des critères morphologiques définis par Katona (1971) *e.g.* développement des appendices.

4.4.3. Sex-ratio

L'observation des photographies a permis de déterminer le sexe de chaque individu - sur la base des critères morphologiques définis par Katona (1971) *e.g.* présence d'une antenne géniculée chez les mâles - et ainsi de déterminer le sex-ratio des différentes générations.

4.4.4. Fécondité

A chaque expérimentation, 40 femelles ovigères ont été sacrifiées. La fécondité a été évaluée par comptage au stéréomicroscope du nombre d'œufs par femelle ovigère après ouverture du sac ovigère.

4.5. Bactéries associées aux copépodes *E. affinis* en estuaire de Seine

4.5.1. Isolement des copépodes de l'estuaire de Seine

Cinq campagnes de prélèvement ont été réalisées de Mars 2011 à mars 2014, les dates sont recensées dans le tableau 14. De retour au laboratoire, les échantillons ont été conservés dans une chambre thermostatée à 15 °C pendant 15 min sous une source lumineuse (915 Lumen). Un quart d'heure après, le surnageant (de volume variable ; environ 2,5 L) a été transféré dans des béciers de 5 Litres contenant de l'eau de mer filtrée traitée à 15 puis transféré dans une ampoule à décanter, sous une source lumineuse (915 Lumen). Après 5 min les organismes ont été séparés de des MES (figure 34), les copépodes remontent à la surface de l'ampoule tandis que les MES décanter dans le fond. Les copépodes récupérés, sont concentrés dans de l'eau physiologique (NaCl, 9 g.L⁻¹), puis la suspension enrichie en copépodes est filtrée sur une rampe à filtration (filtres de cellulose / nitrate Sartorius, de porosité 1,2 mm) (figure 35). La masse humide des copépodes est estimée après pesé du filtre (dont la masse avait été préalablement estimée).

4.5.2. Dissociation des microorganismes des copépodes

4.5.2.1. Microbiote total

Le contenu d'un filtre a été resuspendu dans un tube falcon contenant 15 mL d'eau physiologique, puis les copépodes ont été broyés à l'aide d'un blender pendant 1 min. Cette fraction a été nommée « copépodes totaux broyés » ou CTB. Elle permet l'étude de communauté bactérienne totale associée aux copépodes : microbiote externe et interne.

4.5.2.2. Microbiote externe et microbiote interne

Un second filtre a été resuspendu dans un tube stérile de 50 mL (falcon) contenant de l'eau physiologique, supplémenté à un 1 mM de pyrophosphate inorganique (Na₂Ppi), agité au vortex pendant 3 min, puis soniqué à 60 Hz. A l'issue d'une centrifugation (15 min à 1500x g, 40°C) on obtient (i) un surnageant correspondant à la fraction « eau de lavage représentant les communautés bactériennes associées à la cuticule du copépode

(microbiote externe) et (ii) un culot de copépodes et correspondant à la fraction copépodes lavés broyés représentant majoritairement les communautés bactériennes présentes à l'intérieur du copépode (microbiote interne).

4.5.3. Dénombrement des *Vibrio* sp cultivables

Les trois fractions (microbiote total, microbiote interne, microbiote associé à la cuticule) sont filtrées (porosité 0,45 µm), puis incubés pendant 24 H à 30 °C après dépôt sur le milieu sélectif TCBS (Thio-Citrate-Bile-Sucrose Agar) (figure 34) afin d'isoler les bactéries *Vibrio*. L'alcalinité du milieu associé au citrate de sodium et au thiosulfate inhibe la culture des entérobactéries. Le chlorate de sodium et la bile de bœuf ralentissent la croissance des entérocoques et inhibent le développement des bactéries à Gram positif. Via l'acidification du milieu, résultant de la fermentation du saccharose, les bactéries du genre *Vibrio* provoquent le virage au jaune de l'indicateur au thymol et au bleu de bromothymol. Le thiosulfate présent dans la gélose, constitue une source de soufre permettant aux *Vibrio* (qui sont tous H₂S négatif) de produire du sulfure d'hydrogène révélé en présence de citrate ferrique.

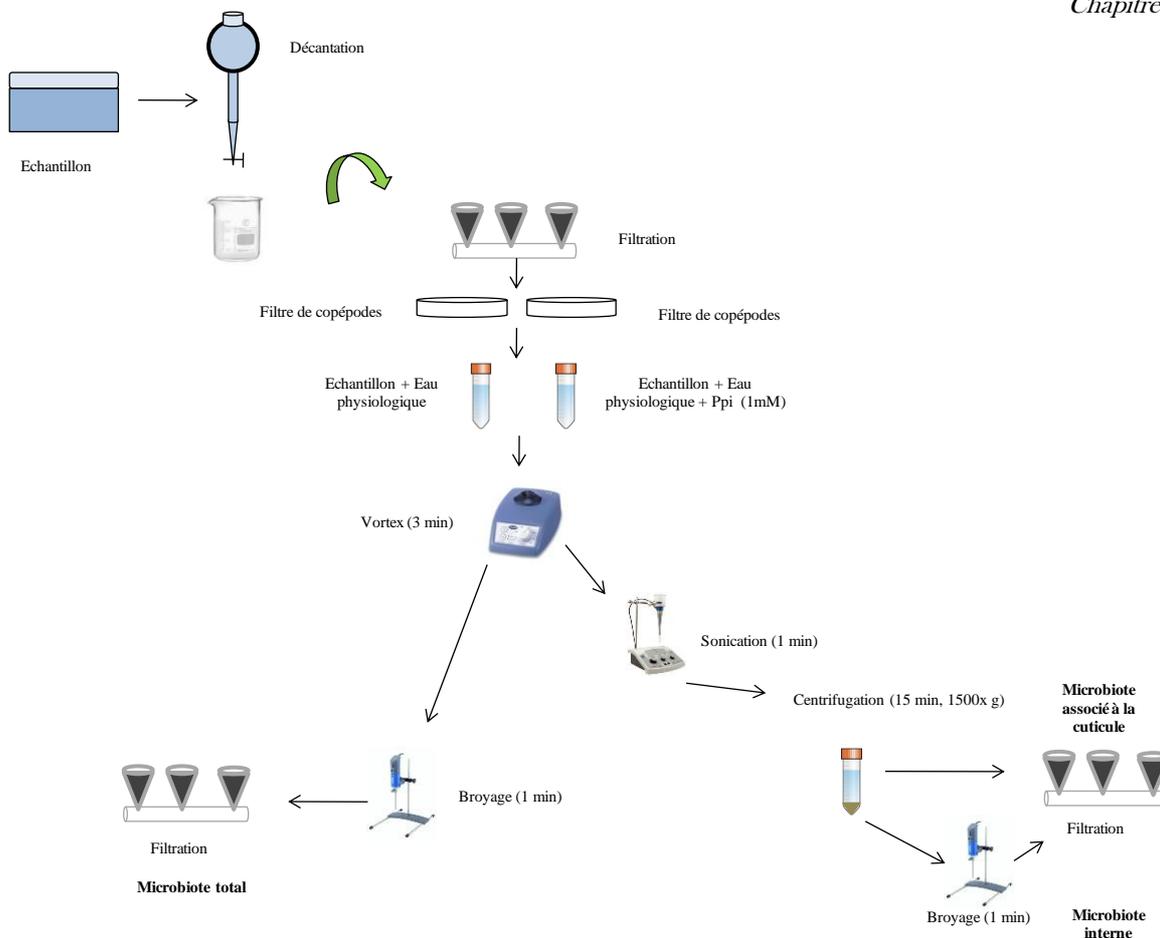


Figure 34 : Isolement des copépodes du prélèvement d'eau et dissociation des microorganismes : Microbiote total, microbiote interne, microbiote associée à la cuticule).



Figure 35 : Etape de filtration etcopépodes sur filtres après l'étape obtenue par séparation den phototropisme.

CHAPITRE 3 :

RESULTATS

Les forêts précèdent les hommes, les déserts les suivent (Chateaubriand)

Lors de la première année de thèse un bio-essai larvaire portant sur la survie et la croissance a été mis au point à l'aide d'élutriats de sédiment de référence enrobé avec des molécules modèles, représentatives de la contamination de l'estuaire de Seine et appartenant à des classes de contaminants différentes. Les contaminants suivants ont été testés : trois HAPs (BaP, DMBA, PHE), deux PCBs (PCB 126 et PCB 153) et un alkylphénol (le 4-NP). En parallèle une étude du microbiome associé au copépode *Eurytemora affinis* en Estuaire de Seine a été entreprise dès la première année. Durant la première moitié de la deuxième année de thèse, le bio-essai larvaire a été validé sur des élutriats de sédiments de l'estuaire de Seine, le long d'un transect amont-aval sur 4 saisons différentes. Pendant la deuxième partie de la deuxième année de thèse, le bio-essai larvaire a été appliqué et amélioré avec le développement du biomarqueur Chitobiase chez cette espèce lors d'une exposition par la voie dissoute à deux contaminants recensés comme étant les plus toxiques lors du développement du bio-essai à savoir le PCB 126 et le 4-NP. Enfin après avoir isolé des souches environnementales de *Vibrio sp.*, le paramètre croissance a été suivi de près lors du bio-essai larvaire au cours d'expositions en conditions contrôlées à des bactéries du genre *Vibrio sp.*

1. Développement d'un bio-essai larvaire « Survie-Croissance » (BASIC) avec une matrice sédimentaire, élutriats de sédiments

1.1. Mise au point du bio-essai sur les élutriats de sédiments enrobés avec des molécules de référence

Lors des expérimentations, deux témoins ont été utilisés : un témoin sans solvant correspondant au sédiment broyé et lyophilisé provenant du site d'Yville-sur-Seine, un témoin solvant composé du sédiment broyé et lyophilisé d'Yville-sur-Seine associé au Diméthylsulfoxyde (DMSO). Les résultats ont démontré que le solvant n'a pas d'effet sur les paramètres sélectionnés dans notre étude (Tableau 20). Lors de la présentation des résultats, seul le contrôle avec solvant sera comparé aux différentes expositions.

Tableau 20 : Survie et Croissance nauplienne (n =10, 3 réplicas) lors d'une exposition de 6 jours à des éluutriats de sédiments considérés comme témoins : (i) Témoin : sédiment provenant du site d'Yville-sur-Seine ;(ii) Témoin Solvant : sédiment d'Yville-sur-Seine associé au DMSO. Les analyses statistiques ont été réalisées par le test de Kruskal-Wallis (p <0,05).

	Survie (%)	Croissance (%)
Témoin	82,2 +/- 8,3	100 +/- 9,6
Témoin Solvant	82,2 +/- 8,3	102 +/- 9,6

1.1.1. La survie

La toxicité des éluutriats de sédiments enrobés a été testée sur les *nauplii* du copépode *E. affinis*. Après six jours d'exposition, il s'avère que les éluutriats obtenus à partir des sédiments de référence enrobés avec les HAPs, sont les plus toxiques pour les *nauplii* d'*E. affinis*, notamment le DMBA et le PHE (Figure 35). Il est à noter que dans le cas du BaP, aucune différence significative n'a été observée après 6 jours d'exposition par rapport au contrôle, malgré une diminution de la survie de 32,5 et 40,5 %, observée respectivement pour les concentrations les plus élevées. Le composé le plus toxique au niveau léthal est le DMBA, puisqu'une diminution significative de la survie (60 %) a été observée dès 6092 ng.g⁻¹ de sédiments sec. De plus, à 36046 ng.g⁻¹ aucun *nauplii* n'a survécu au bout des 6 jours d'exposition. Lors des expositions au PHE une diminution significative de 55 % pour le paramètre survie a été observée à la plus forte concentration testée (58541 ng.g⁻¹ de sédiment sec) par rapport au contrôle. Dans le cadre des expositions aux PCBs et au 4-NP, aucun effet significatif sur la survie n'a été mis en évidence après 6 jours d'exposition par rapport au contrôle (Figure 36 et 37), bien que dans le cas du 4-NP des diminutions de la survie de 33 % aient été enregistrées aux deux plus fortes concentrations.

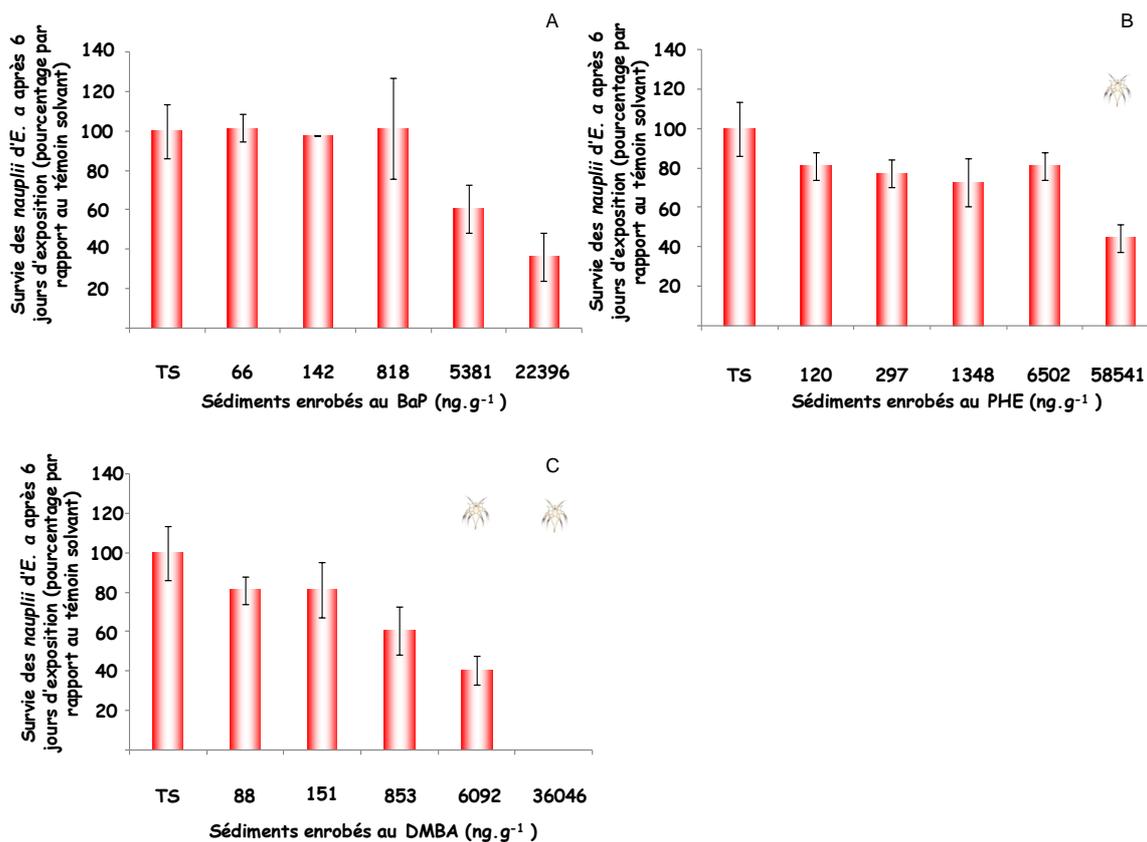


Figure 36 : Survie larvaire (n =10, 3 réplicats) lors d'une exposition de 6 jours à des éluutriats sédiments enrobés aux HAPs (A : BaP ; B : PHE ; C : DMBA). Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal-Wallis ; p<0,05).

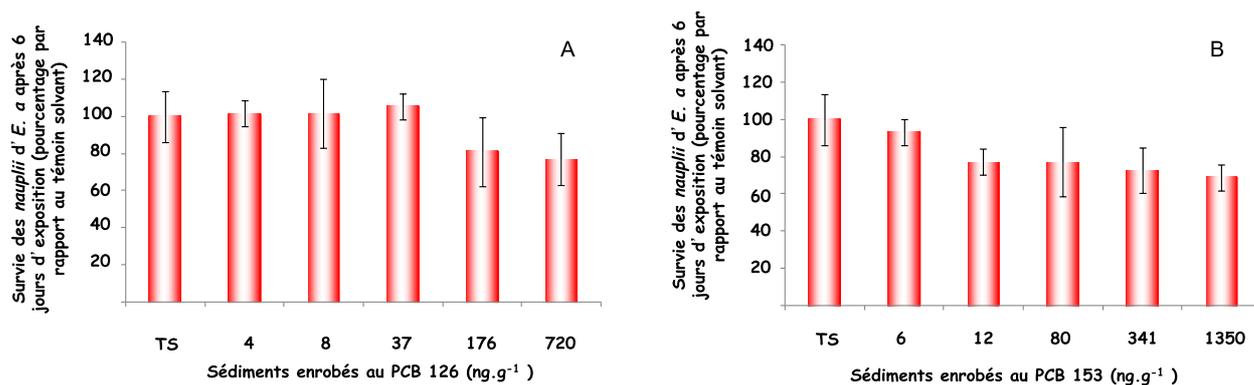


Figure 37 : Survie larvaire (n= 10, 3 réplicats) lors d'une exposition de 6 jours à des sédiments enrobés aux PCBs (A : PCB 126 ; B, PCB 153). Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal-Wallis ; p<0,05).

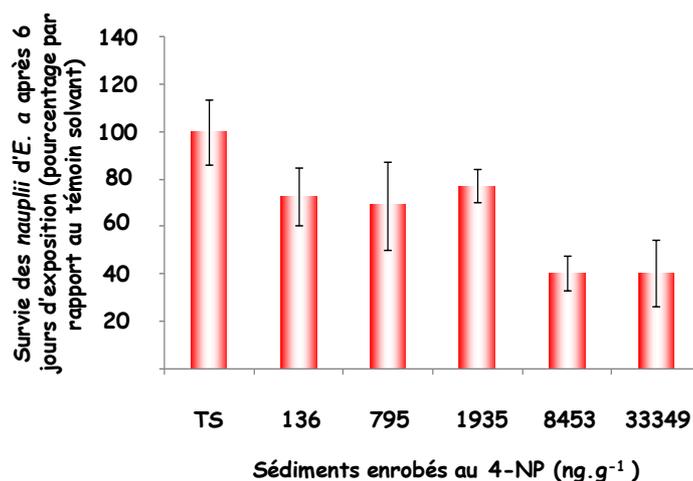


Figure 38 : Survie larvaire (n= 10, 3 réplicats) lors d'une exposition de 6 jours à des sédiments enrobés aux 4-NP. Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal-Wallis ; p<0,05).

En plus de la toxicité létale, la toxicité sur la croissance a été évaluée après 6 jours d'exposition aux mêmes contaminants.

1.1.2. La croissance

L'exposition aux éluviats de sédiments dopés aux HAPs, montre que le BaP est le composé entraînant des effets sur la croissance les plus importants. Des diminutions de la croissance de 27 %, 27 %, 32 % et 41 % par rapport au contrôle ont été observées respectivement pour des concentrations de 142, 818, 5381, 22396 ng.g⁻¹ de sédiments secs (Figure 39 A). Pour le DMBA une diminution significative de la croissance de 30 % par rapport au contrôle a été observée à 6092 ng.g⁻¹ de sédiment sec. La croissance n'a pas pu être analysée à la plus forte concentration à cause de la très forte mortalité observée, en effet la totalité des organismes n'a pas survécu à cette exposition (Figure 39 B). Concernant le PHE, des diminutions significatives de 30 %, 33 % et 45 % ont été relevées respectivement pour les concentrations de 297, 6502 et 58541 ng.g⁻¹ de sédiment sec par rapport au témoin. Cependant une exposition au phénanthrène de 1348 ng.g⁻¹ de sédiment sec n'entraîne statistiquement aucune différence significative avec le contrôle, malgré une diminution observée de la croissance de 16 % (Figure 39 C).

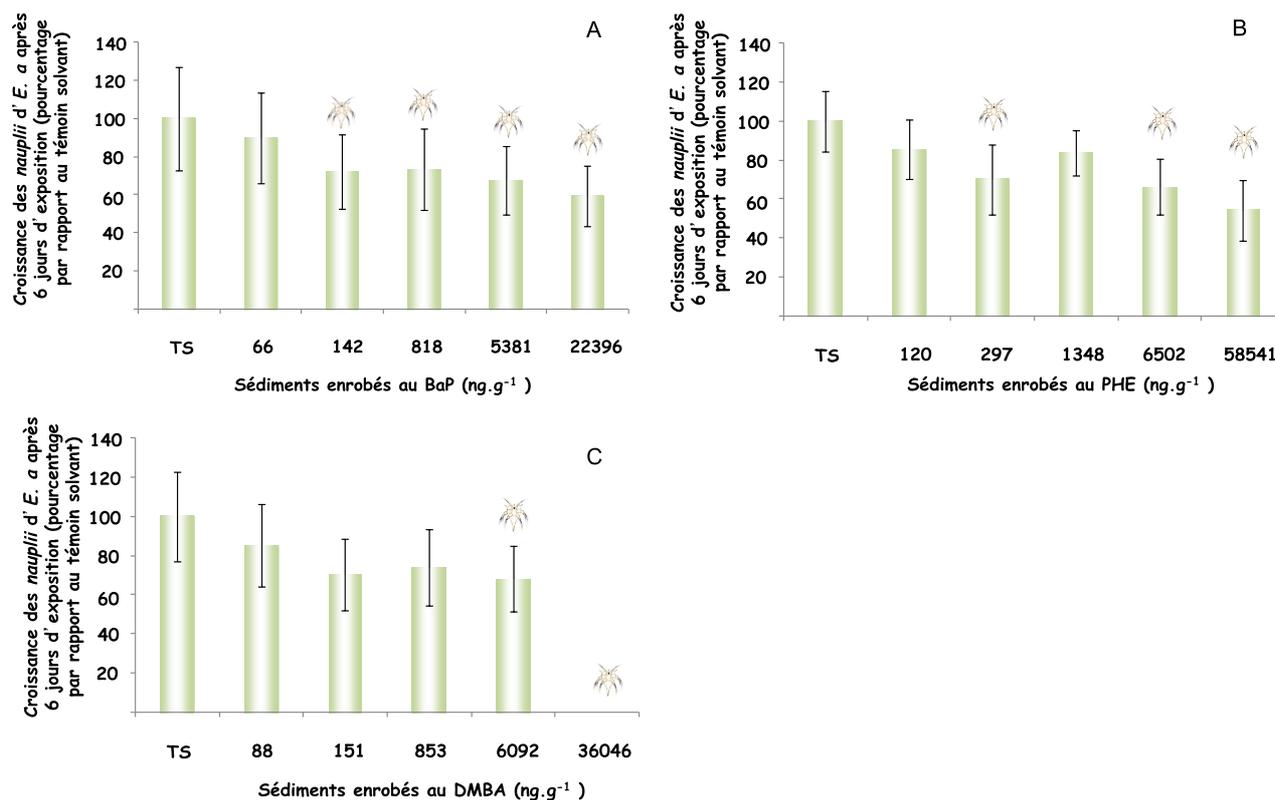


Figure 39 : Croissance larvaire (n= 30-50) lors d'une exposition de 6 jours à des sédiments enrobés aux HAPs (A : BaP ; B, PHE ; C DMBA). Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal- Wallis ; p<0,05).

Pour les PCBs, une diminution significative de 33% de la croissance nauplienne a été enregistrée au cours des expositions avec le PCB 126 aux deux plus fortes concentrations testées (Figure 40 A), 176 et 720 ng.g⁻¹ de sédiment sec, alors que le PCB 153 n'a eu aucun effet négatif sur la croissance et ce quelque soit la concentration testée (Figure 40 B).

Les nauplii du copépode *E. affinis* ont également été exposés pendant 6 jours au 4-NP. Après 6 jours d'exposition, une diminution significative de la croissance de 33 % par rapport au témoin a été enregistrée aux deux plus fortes concentrations, 8453 et 33 349 ng.g⁻¹ de sédiment sec (Figure 41).

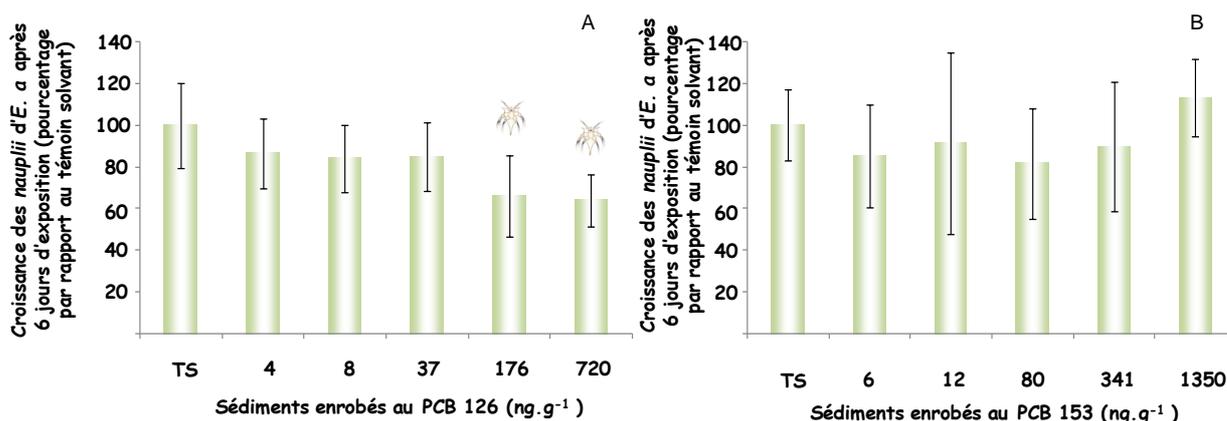


Figure 40 : Croissance larvaire (n= 30-50) lors d'une exposition de 6 jours à des sédiments enrobés aux PCBs (A : PCB 126 ; B, PCB 153). Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal- Wallis ; $p < 0,05$).

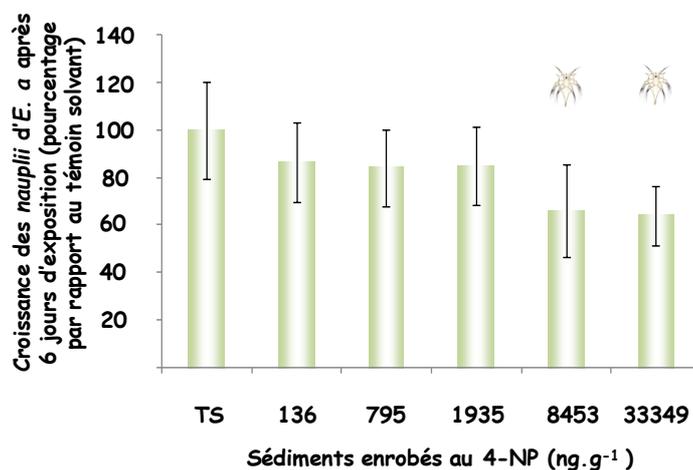


Figure 41 : Croissance larvaire (n= 30-50) lors d'une exposition de 6 jours à des sédiments enrobés aux 4-NP. Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal-Wallis ; $p < 0,05$).

1.2. Validation du bio-essai larvaire « survie-croissance » (test BASIC) sur des éluviats de sédiments naturels prélevés en estuaire de Seine

Une fois le bio-essai larvaire « Survie-Croissance » mis au point sur des éluviats de sédiments enrobés avec des molécules modèles, il a été validé sur des éluviats de sédiments naturels lyophilisés et broyés provenant de l'estuaire de Seine (Campagne TOXSEINE). Cette étape a permis d'évaluer la toxicité sur *Eurytemora affinis* des sédiments de l'estuaire de Seine, habitat naturel de ces copépodes. Dans ce cas d'exposition, le contrôle choisi est le Témoin sans solvant (Tableau 20).

1.2.1. La survie

Lors de la campagne du mois de février (période de crue avec un débit de $650 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$), la survie des nauplii du copépode *E. affinis* semble être affectée après 6 jours d'exposition à tous les éluutriats de sédiments naturels quelque soit le point de prélèvement (Figure 42 A). Des différences significatives par rapport au témoin ont été observées sur la totalité des sites estuariens. Plus particulièrement, une nette diminution de la survie de 33 % a été enregistrée lors des expositions aux éluutriats de sédiments en provenance de la Bouille. Dans le cas des autres sites, les effets sur la survie sont également significatifs malgré des diminutions plus marginales. Notamment, des diminutions respectives de 7, 10, 13, 17 et 17 % ont été enregistrées lors d'exposition aux éluutriats des sédiments de Poses, Oissel, Quillebeuf-sur-Seine, Pont de Normandie et Caudebec-en-Caux.

Pour les éluutriats des sédiments prélevés au mois de décembre pendant la période de crue (débit de $450 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$), seuls ceux en provenance de Poses semblent avoir un effet significatif sur la survie des nauplii du copépode *E. affinis* (Figure 42 B). En effet, une diminution significative de 70 % de la survie a été évaluée chez les nauplii exposées à ces éluutriats de sédiments. Dans le cas des autres expositions, des diminutions d'environ 14 % de la survie ont été enregistrées.

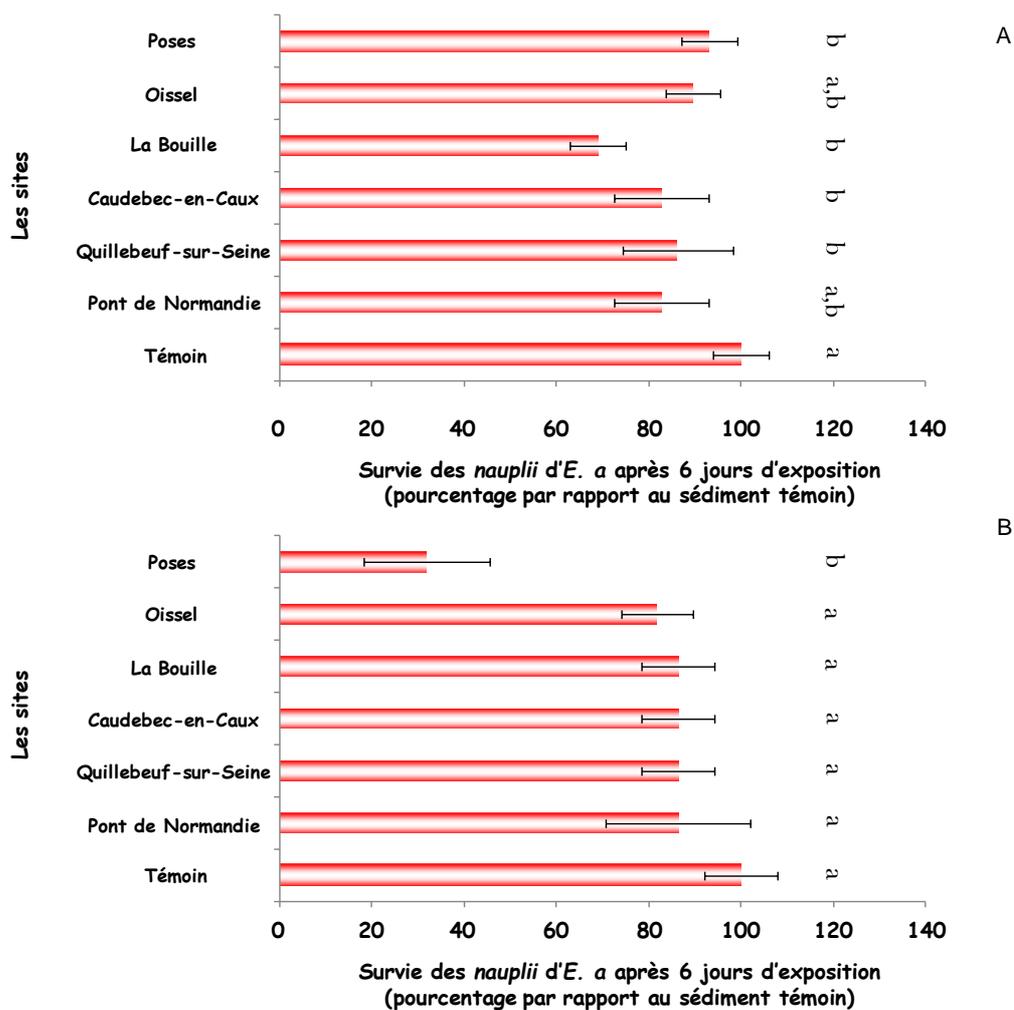


Figure 42 : Survie larvaire (n=10, 3 réplicas) lors d'une exposition de 6 jours à des éluviats de sédiments naturels provenant de l'estuaire de Seine (A : février, B : Décembre). Les lettres (a, b) indiquent une différence significative en comparaison avec le sédiment de référence (Yville-sur-Seine) (Test de Tuckey ; $p < 0,05$).

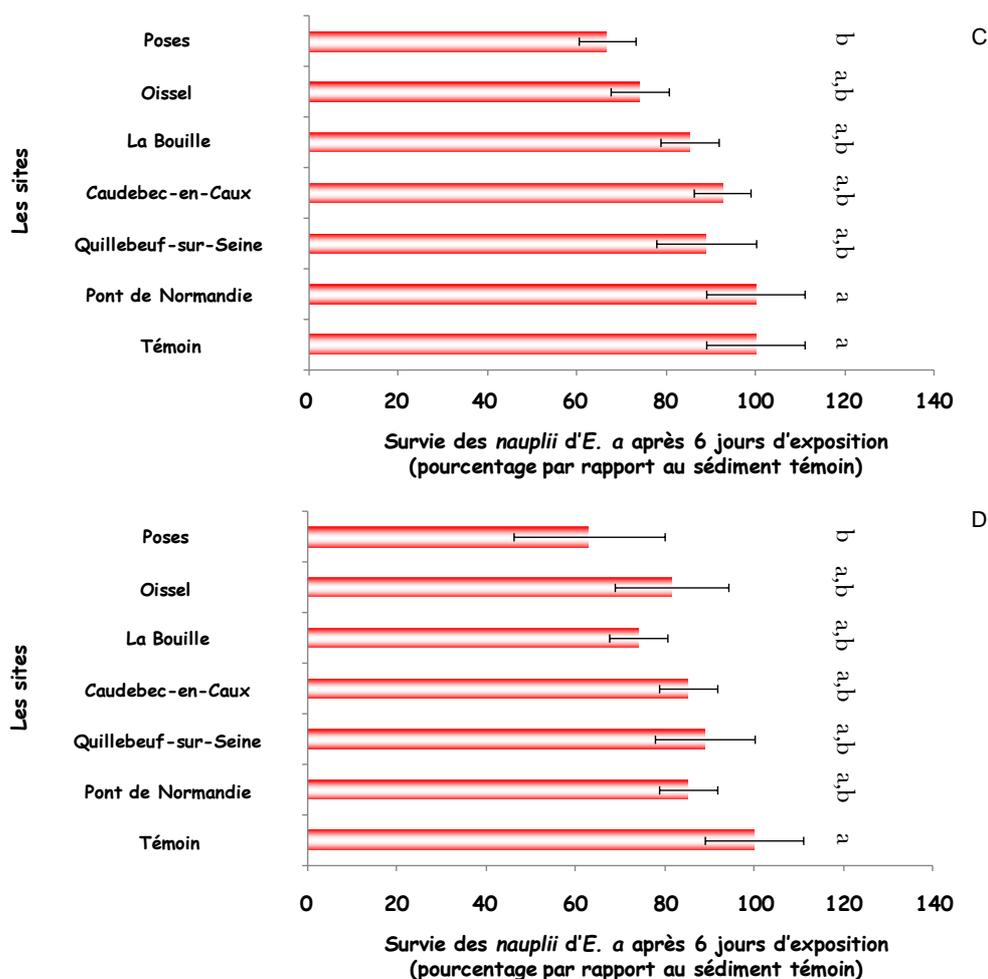


Figure 43 : Survie larvaire (n=10, 3 réplicas) lors d'une exposition de 6 jours à des éluviats de sédiments naturels provenant de l'estuaire de Seine (C : Août, D : Mai). Les lettres (a, b) indiquent une différence significative en comparaison avec le sédiment de référence (Yville-sur-Seine) (Test de Tuckey ; $p < 0,05$).

Lors des prélèvements réalisés au mois de mai et août (débits respectifs de 300 et 180 $m^3 \cdot s^{-1}$), les résultats sont identiques (Figure 43 C et D). Aucun effet significatif n'a été observé sur la survie à l'exception des éluviats de sédiments en provenance de Poses. Plus particulièrement, des diminutions significatives de 37 et 33 % ont été observés respectivement pour le mois de mai et d'août. Pour les autres sites, les expositions aux éluviats de sédiments sur la survie présentent des effets beaucoup plus marginaux, marqués par une baisse comprise entre 25 et 11 % pour respectivement les sites de la Bouille et Quillebeuf-sur-Seine en mai 2009. En août 2009, seul un effet négatif de 25 % sur la survie est observé chez les nauplii avec les éluviats des sédiments de Oissel.

La croissance des nauplii a été observée également en parallèle après six jours d'exposition.

1.2.2. La croissance

Les effets observés sur la croissance sont, dans la plupart des cas, significatifs lors des expositions aux éluutriats de sédiments prélevés au mois de Février 2009 (Figure 44 A). Notamment des retards de croissance significatifs de 13,6 ; 13,7 ; 16,3 et 16,2 % ont été enregistrés chez les nauplii du copépode *E. affinis* exposées respectivement aux éluutriats des sédiments en provenance des sites de Quillebeuf-sur-Seine, Caudebec-en-Caux, la Bouille et Poses. Les éluutriats provenant des deux autres sites (*i.e* Pont de Normandie et Oissel) ne semblent pas avoir d'effet sur la croissance avec des diminutions marginales de 7 et 8 %.

Au contraire, dans les sédiments prélevés en Décembre 2009, on observe une augmentation significative de la croissance chez les nauplii du copépode *E. affinis* de 29, 53, 34 et 74 % sur les sites de Caudebec-en-Caux, la Bouille, Oissel et Poses (figure 44 B).

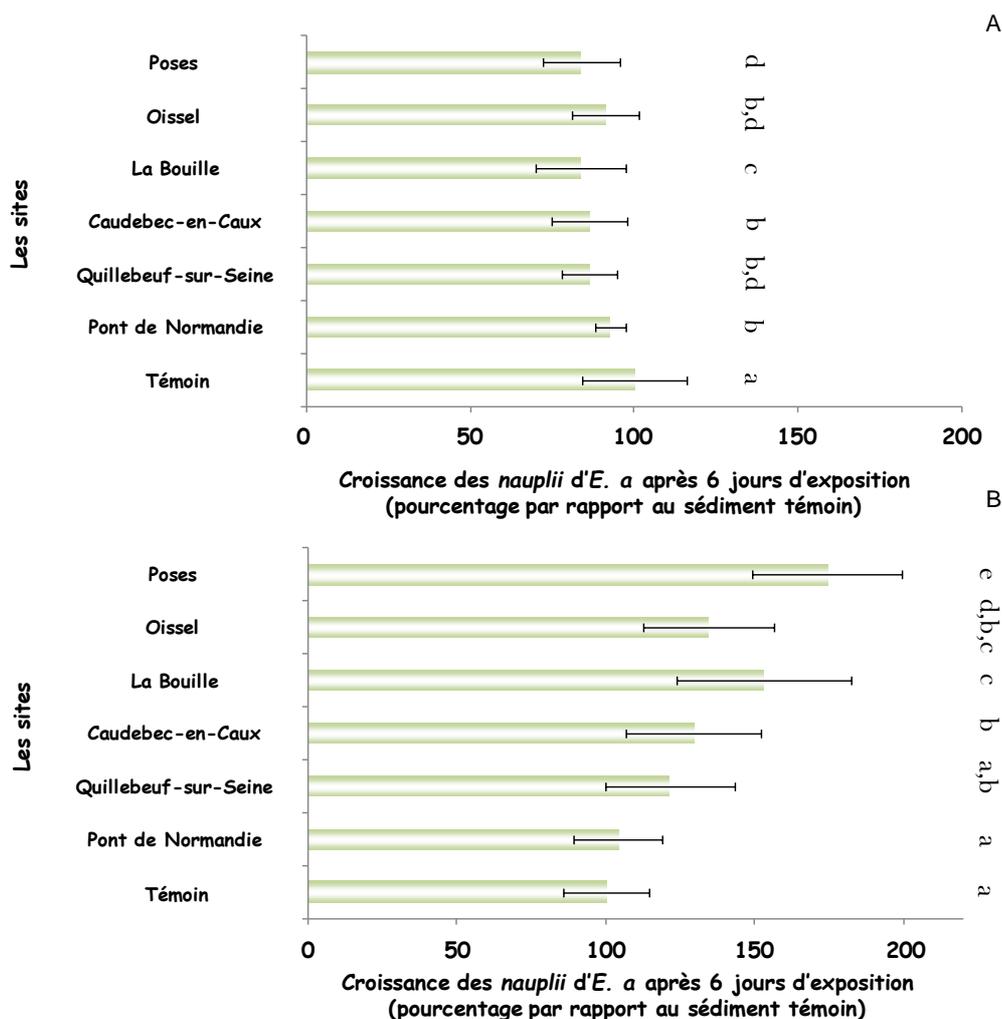


Figure 44 : Croissance larvaire (n=30-50) lors d'une exposition de 6 jours à des éluviats de sédiments naturels provenant de l'estuaire de Seine (A : février, B : Décembre). Les lettres (a, b) indiquent une différence significative en comparaison avec le sédiment de référence (Yville-sur-Seine) (Test de Tuckey ; $p < 0,05$).

En revanche, en période d'étiage (mai et août), les variations observées sur la croissance restent marginales (Figure 45 C et D), avec des différences de 7 à 19 % pour le site du pont de Normandie et de Quillebeuf-sur-Seine en mai, et de 3 à 13 % à Poses et la Bouille en août.

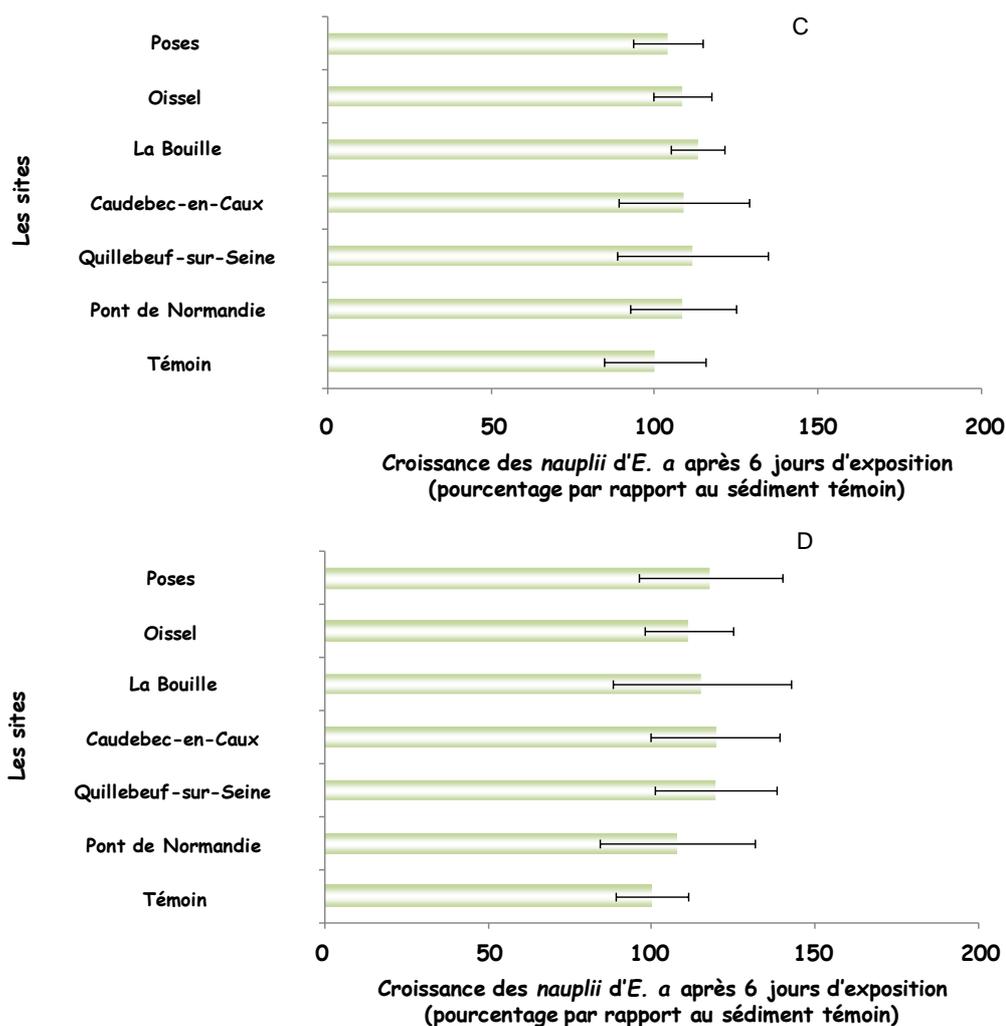


Figure 45 : Croissance larvaire (n=30-50) lors d'une exposition de 6 jours à des éluviats de sédiments naturels provenant de l'estuaire de Seine (C : Août, D : Mai). Les lettres (a, b) indiquent une différence significative en comparaison avec le sédiment de référence (Yville-sur-Seine) (Test de Tuckey ; $p < 0,05$).

Dans le but de compléter cette étude, des analyses plus approfondies ont été réalisées sur des sédiments prélevés au mois de février, avec des mesures de concentrations en HAPs, PCBs, OCPs, et des analyses granulométriques.

1.2.3. Granulométrie et teneur en HAPs, OCPs et PCBs dans les sédiments naturels

L'analyse granulométrique permet de caractériser des sédiments fins selon leur taille : le sable de 63 à 2000 μm , les limons : de 63 μm à 2 μm et les argiles < 2 μm . Dans les sédiments prélevés au mois de février 2009 la teneur en argile est similaire (de 3,2 à 5,5%), tandis que les fractions limoneuses et sableuses varient de 49,3 à 79,5% pour les limons et de

15,1 à 46,3% pour les sables (tableau 21). Les sédiments du Pont de Normandie, de la Bouille et de Poses sont particulièrement riches en argile avec des taux supérieurs à 70%.

	Argiles (%)	Limons (%)	Sables (%)
Pont de Normandie	5.5	79.5	15.1
Quillebeuf-sur-Seine	4.4	49.3	46.3
Caudebec-en-Caux	3.2	56.0	42.9
Duclair	3.4	60.0	36.0
La Bouille	4.4	72.8	22.8
Oissel	4.5	55.3	40.2
Poses	5.1	70.7	24.2

Tableau 21: Granulométrie des sédiments prélevés en estuaire de Seine en Février 2009.

Les résultats des analyses chimiques (tableau 22) montrent que les HAPs, les PCBs et les OCPs sont présents dans tous les échantillons sédimentaires prélevés au mois de Février 2009 (tableau 22). Les concentrations les plus élevées en HAPs ont été mesurées dans les sédiments de Caudebec-en-Caux (9862 ng.g⁻¹) et de Poses (9613 ng.g⁻¹), la contamination en HAPs des sites : Pont de Normandie, La Bouille et Oissel avoisine les 4000 ng.g⁻¹ de sédiments sec et le site le moins contaminé est Quillebeuf-sur-Seine (1096 ng.g⁻¹ de sédiment sec). En parallèle, les concentrations en PCBs observées sont d'un d'ordre de grandeur inférieur, le site le plus contaminé étant celui du Pont de Normandie (174 ng.g⁻¹), suivi des sites de Poses (94 ng.g⁻¹), la Bouille (55 ng.g⁻¹), Oissel (34 ng.g⁻¹), Quillebeuf-sur-Seine (13 ng.g⁻¹) et Caudebec-en-Caux (9 ng.g⁻¹). Pour les OCPs, la contamination dans les sédiments varie d'environ 1 (Caudebec-en-Caux) à 17,9 ng.g⁻¹ (Poses).

Tableau 22 : teneur en HAPs, PCBs et OCPs des sédiments prélevés en estuaire de Seine en Février 2009.

Composés	Pont de Normandie	Quillebeuf-sur-Seine	Caudebec-en-Caux	La Bouille	Oissel	Poses
∑ HAPs (ng.g ⁻¹)	3979,00	1096,00	9862,00	4499,00	4197,00	9613,00
∑ PCBs (ng.g ⁻¹)	174,20	12,94	8,98	54,83	34,12	94,28
∑ OCPs (ng.g ⁻¹)	15,99	2,88	0,99	8,13	2,83	17,86

1.2.4. Classification des sites selon leurs caractéristiques physico-chimiques à l'aide d'une analyse en composante principale (ACP).

Six variables (HAPs, PCBs, OCPs, argile, limon et sable) ont été incluses dans l'ACP. Le pourcentage d'inertie représenté par les variables est exposé dans la figure 46A. Les deux premiers axes représentent 92,9 % de la variance totale, et sont donc suffisants pour représenter un cercle des corrélations (Figure 46 B). Les variables apparaissent bien représentées puisqu'elles sont très proches des bords du cercle (rayon 1). La totalité des 6 variables peuvent donc être expliquées via le cercle des corrélations. Tandis que les HAPs ne semblent pas avoir de lien particulier avec les 5 autres variables (angle de 90 °), les PCBs, OCPs, argile et limon semblent être très positivement corrélées. Ces contaminants sont donc associés aux particules fines. En revanche, ce groupe de variables semblent être très négativement corrélé avec la variable « sable ». Ces données semblent être confirmées par l'analyse des clusters (Figure 46 C). En effet, 2 groupes de sites s'opposent, le groupe 1 représenté par les sites riches en sable et pauvres en polluants (Oissel, Quillebeuf-sur-Seine, Caudebec-en-Caux) et le groupe 2 représenté par les sites riches en argile et en limon et fortement contaminés par les PCBs et OCPs (La bouille, Poses, Pont de Normandie).

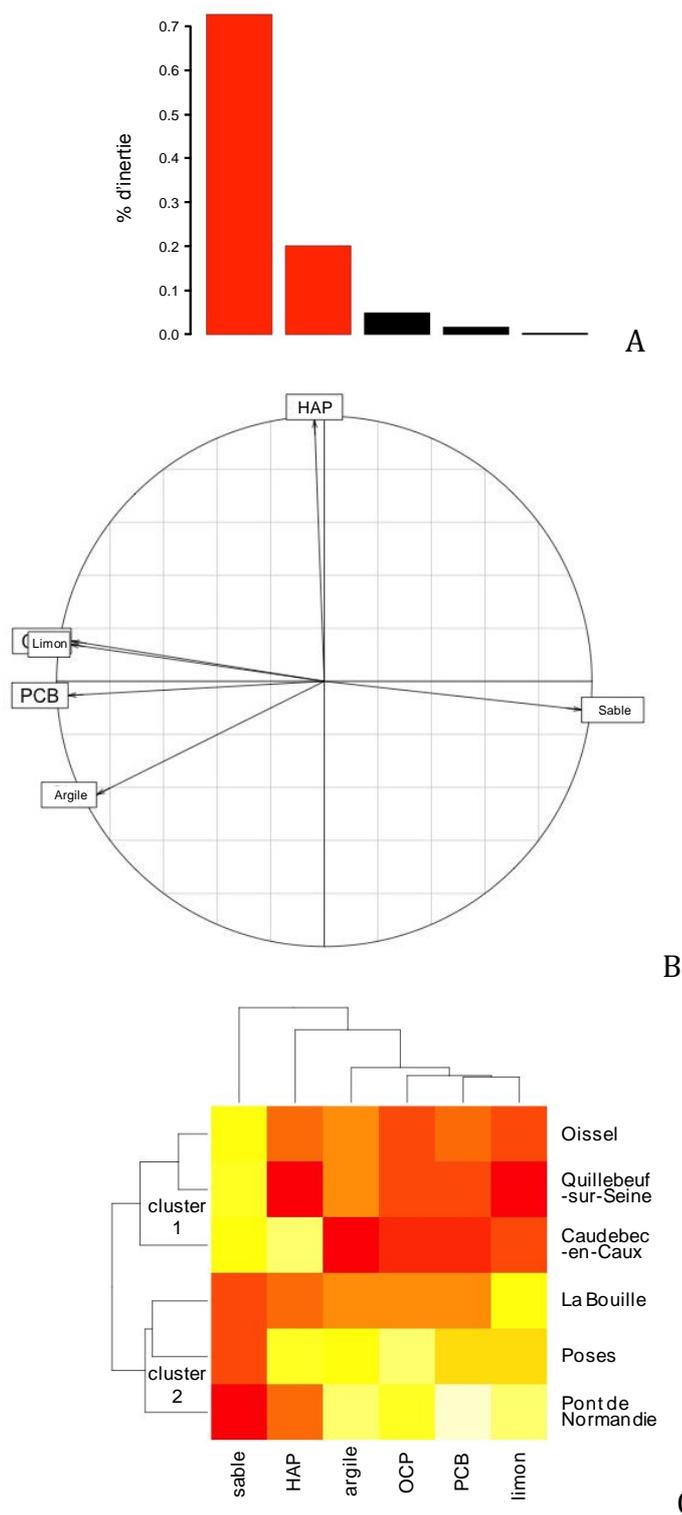


Figure 46 : Analyse des relations entre les paramètres chimiques et physiques des sédiments naturels de l'estuaire de la Seine à l'aide d'une analyse en composantes principales (ACP). Six variables (HAPs, PCBs, OCPs, argile limon et sable) pour chaque site d'échantillonnage (Pont de Normandie, Quillebeuf-sur-Seine, Caudebec-en-Caux, La Bouille, Oissel et Poses) ont été incluses dans l'ACP. (A) Pourcentage d'inertie. (B) Cercle de corrélation des 6 variables en fonction des deux premiers axes représentant 92,9 % d'inertie. (C) Heatmap des propriétés physico-chimiques des sédiments naturels de l'estuaire de la Seine. Plus la couleur est intense, moins la variable est exprimée. Les dendrogrammes secondaires ont été calculés en utilisant une méthode de classification UPGMA.

Après la mise au point et la validation du bio-essai « Survie-Croissance » (Test BASIC) lors d'expositions avec des éutriats mimant le transfert des contaminants par la phase particulaire et dissoute, ce bio-essai a été utilisé lors d'expositions uniquement par la voie dissoute à des contaminants, notamment le B(a)P, le PCB 126 et le 4-NP. Les concentrations choisies sont les concentrations environnementales, retrouvées en estuaire de Seine dans la colonne d'eau. Comme lors du développement de BASIC, les expositions ont duré six jours, et afin d'évaluer plus précisément les effets sur la survie et la croissance, les paramètres ont été enregistrés tous les deux jours (J2, J4 et J6). De plus, pour appréhender les mécanismes mis en jeu dans les perturbations de la croissance, deux autres paramètres ont été évalués en parallèle de la croissance : l'activité chitobiase, et le développement larvaire par l'identification précise des stades naupliens (N1 à N6) et copépodites (C1 à C5) le cas échéant.

2. Application du test BASIC par voie d'exposition dissoute

2.1. Mise au point de l'activité chitobiase

Les expérimentations concernant la mise au point de l'activité chitobiase ont été réalisées dans les mêmes conditions que le test BASIC (20 nauplii dans un volume de 25 mL). L'objectif était à terme de déterminer la concentration saturante en substrat, le MUFNAG. Une gamme de concentration en MUFNAG allant de 0 à 1,25 mM a été testée au regard de la bibliographie sur le sujet. La concentration en substrat saturante a été déterminée à 0,31 mM, selon le protocole décrit chez le copépode *Acartia tonsa*, la mysïde *Metamysidopsis elongata atlantica*, et la balane *Balanus improvisus* (Avila et al, 2011) (Figure 47).

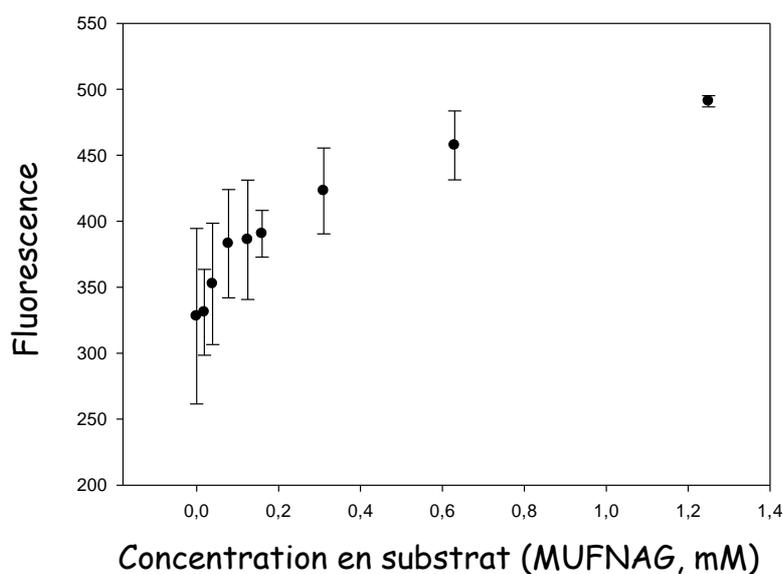


Figure 47 : Mesure de l'activité enzymatique (chitobiase) en fonction de la concentration en substrat (MUFNAG, méthyl-umbélliféryl N-acetyl-glucosamine) chez les nauplii d'*Eurytemora affinis*.

2.2. Survie

Lors de la réalisation du test *BASIC*, aucun nauplii n'a survécu au bout des 6 jours d'exposition au *B(a)P* à la dose $1X$ et $0,5X$ (X représentant la concentration environnementale).

Lors des expositions au PCB 126 et au 4-NP aucun effet significatif sur la survie n'a été enregistré lors du bioessai « *BASIC* » après 2, 4 et 6 jours d'exposition (Figure 48). On peut néanmoins relever une légère baisse de la survie dès le 4^{ème} jour d'exposition de 3 et 9 % respectivement pour le PCB 126 et 4-NP ; qui se confirme au bout des 6 jours avec une survie des nauplii de 92 % et 96 % pour les expositions au PCB126 et au 4-NP.

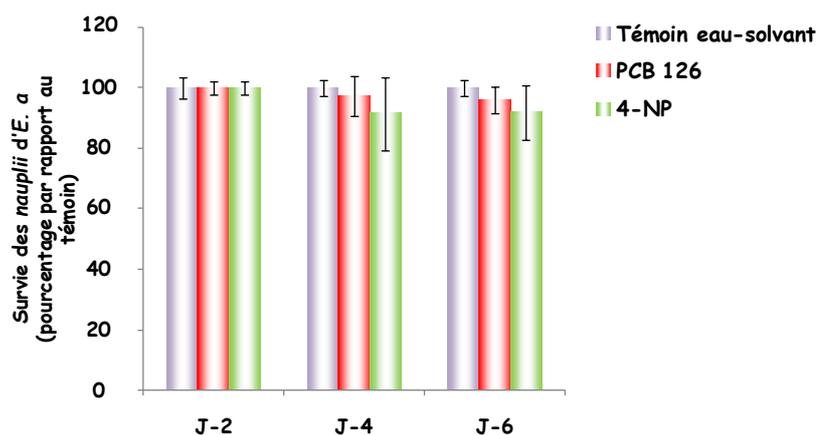


Figure 48 : Survie larvair (n= 10, 3 réplicas) lors d'une exposition de 2, 4 et 6 jours à deux contaminants en solution (PCB 126 et 4-NP). Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal-Wallis ; $p < 0,05$).

2.3. Croissance

Après deux jours d'expositions au PCB 126 et au 4-NP, on observe une diminution significative respective de 50 et de 40 % de la croissance des nauplii d'*E. affinis* alors qu'une augmentation significative de la croissance de 78 % est observée après 4 jours (figure 49), et qu'aucune différence significative n'a été observée pour le PCB 126 bien qu'une augmentation de la croissance de 57 % soit enregistrée. Enfin à la fin de l'expérimentation après 6 jours d'exposition au PCB 126 et au 4NP, aucune différence significative n'est observée par rapport au témoin (Figure 49).

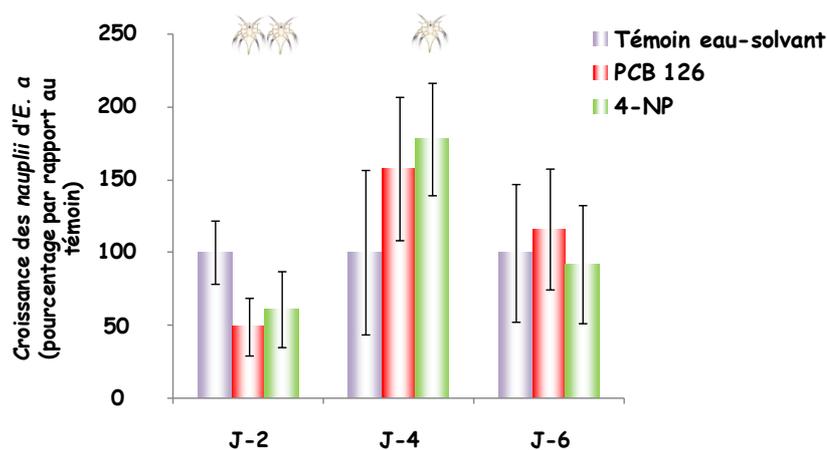


Figure 49 : Croissance larvair (n= 30-50) lors d'une exposition de 2, 4 et 6 jours à deux contaminants en solution (4-NP et PCB 126). Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal-Wallis ; $p < 0,05$).

2.4. Activité chitobiase

Les résultats sur les niveaux d'activité chitobiase chez les nauplii d'*Eurytemora affinis* sont corrélés avec ceux observés sur la croissance (Figure 50). Après 2 jours d'exposition, une baisse significative des niveaux d'activité chitobiase de 70 et 68 % a été enregistrée pour respectivement le PCB 126 et le 4-NP par rapport au témoin. Après quatre jours d'exposition, comme pour la croissance, une augmentation de 20 % des niveaux d'activité chitobiase a été enregistrée dans le cadre des expositions au 4-NP mais cette augmentation est non significative. Les niveaux d'activité chitobiase dans le cadre des expositions au PCB 126 reste similaires au contrôle. Enfin, après 6 jours d'exposition, comme dans le cadre de la croissance, aucun effet significatif sur les niveaux d'activités chitobiase n'a été enregistré malgré des hausses de 41 et 32 % respectivement pour le 4-NP et le PCB 126 (Figure 50).

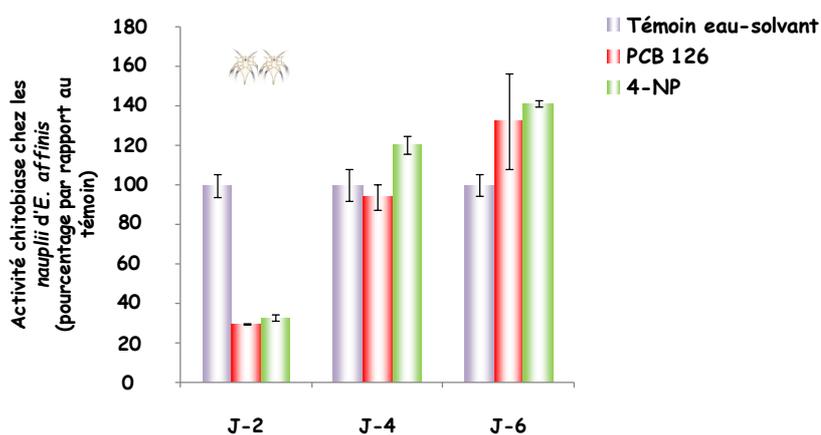


Figure 50 : Activité chitobiase après 2, 4 et 6 jours d'exposition à deux contaminants (4-NP et PCB 126). Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin solvant (TS) (Kruskal-Wallis ; $p < 0,05$).

2.5. Développement larvaire

En parallèle de l'activité chitobiase, le développement larvaire a été observé tous les deux jours au cours des expositions pour chacun des contaminants.

Après deux jours d'exposition, une majorité des nauplii a atteint le stade N4 (73 %) chez les témoins. Pour le PCB 126, la moitié des individus sont identifiés comme étant au stade N3 et N4 (soit 50 % des individus pour chacun des deux stades). Dans le cas des

expositions au 4-NP, 60 % des individus ont atteint le stade N3 contre seulement 40 % pour le stade N4 (Figure 51).

Après 4 jours d'exposition, une majorité des organismes a atteint le stade N5 (44 %) chez les témoins tandis que 27 % des individus sont respectivement au stade N4 et N6 (dernier stade larvaire) (Figure 52). Il est remarquable d'observer dans le cas de l'exposition au PCB 126, que toutes les nauplii ont atteint les deux derniers stades de développement nauplien. En effet les individus se répartissent entre les stades N5 et N6 avec une majorité de *nauplii* au stade N5, 54 %, contre 46 % au dernier stade nauplien (N6). Pour les expositions au 4-NP, 21 % des individus sont au stade N4 tandis que 36 et 43 % sont respectivement au stade N5 et N6.

Enfin après 6 jours d'exposition, la totalité des individus ont franchi avec succès le stade nauplien excepté 15 % des individus chez les témoins (Figure 53). Dans cet échantillon, 23 % des individus sont au stade C1, et 62 % ont atteint le stade C2. Dans le cas des expositions au 4-NP, une majorité d'individus a atteint le stade C2 (60 %) et seulement 40 % sont au stade C1. Lors des expositions au PCB 126, 47 % ont atteint le stade C2 contre 53 % pour le stade C1.

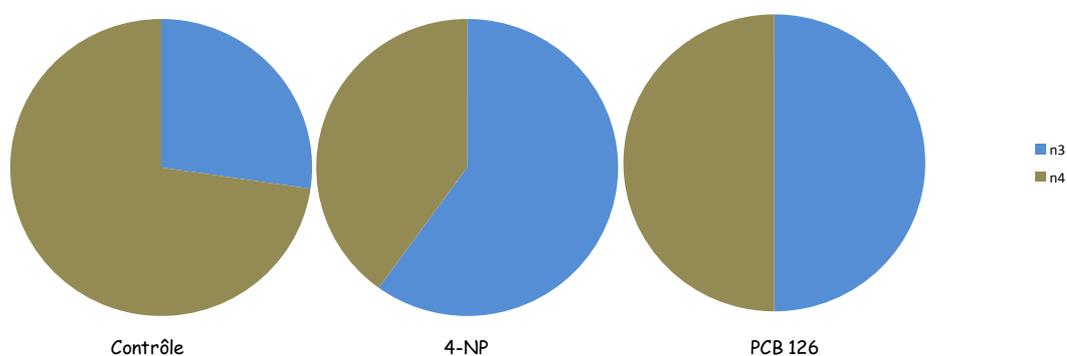


Figure 51 : Répartition des stades larvaires chez les témoins et après 2 jours d'exposition à deux contaminants (4-NP et PCB 126).

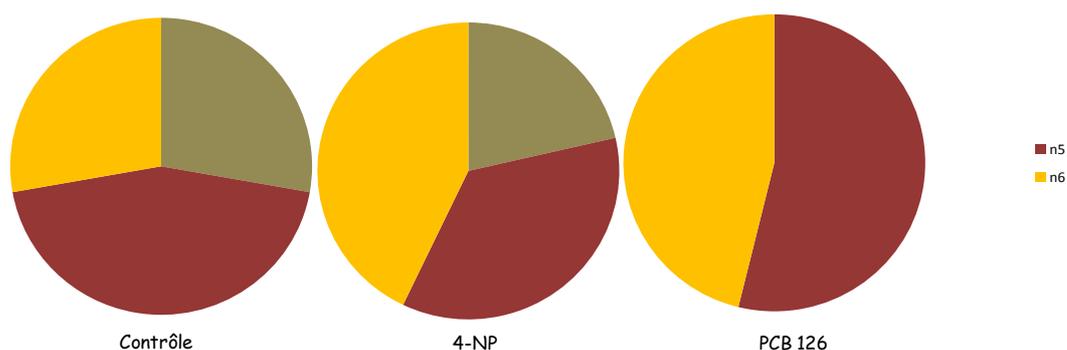


Figure 52 : Répartition des stades larvaires chez les témoins et après 4 jours d'exposition à deux contaminants (4-NP et PCB 126).

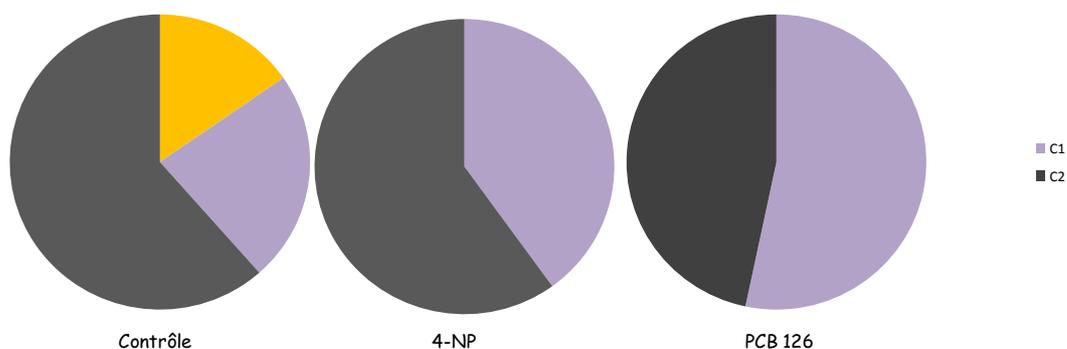


Figure 53 : Répartition des stades larvaires et copépodites chez les témoins et après 6 jours d'exposition à deux contaminants (4-NP et PCB 126).

2.6. Effets populationnels

En parallèle, les effets populationnels au cours d'une exposition à long terme du B(a)P, du PCB 126 et du 4-NP ont été recherchés afin de tester l'adaptation d'Eurytemora affinis sur trois générations. Les paramètres enregistrés ont été : la densité, la fécondité, le sex-ratio et enfin la longueur du prosome sur trois générations successives.

Au lancement de la F1 avec les femelles ovigères, seuls un réplica de l'exposition au PCB 126 (1X) et le témoin acétone ont pu être analysés. En effet, les expérimentations menées avec le BaP (1X) et le 4-NP (1X) ont entraîné la mort de toutes les femelles ovigères dès le premier jour de l'exposition. Par conséquent, les expositions ont été lancées de nouveau avec des demi-doses (0,5 X), mais seuls les deux réplicats exposés au 4-NP ont

été menés jusqu'à la fin de la F2. Le B(a)P, quelque soit la concentration testée (1X et 0,5 X), s'est avéré être le plus toxique des contaminants pour le copépode *E. affinis*.

Compte tenu des mortalités observées avec certaines expositions, le suivi « multi génération » a été fait en deux étapes successives. Dans un premier temps nous avons obtenu un suivi sur trois générations du témoin et du PCB 126 (1X). Par la suite, une deuxième série d'exposition au 4-NP (0,5 X) et témoin acétone a permis de réussir un suivi complet sur 3 générations.

2.6.1. Densité et Survie

La densité (le nombre d'individus dans un béccher de 2L) a été évaluée pendant trois générations successives chez le copépode *E. affinis*. Des variations importantes du nombre d'individus chez les organismes témoins ont été observées avec une diminution de 40 % entre la première et la seconde génération. En revanche, entre la seconde et la troisième génération aucune variation n'a été enregistrée (Figure 54), impliquant que l'effet semble se stabiliser. Les patterns observés sont différents dans le cadre des expositions aux contaminants. Une augmentation de la densité entre la première et la seconde génération de 265 et 1631 % a été respectivement observée pour le PCB 126 et le 4-NP par rapport au témoin (Figure 54). Par la suite, entre la seconde et la troisième génération l'effet s'accroît dans le cadre du PCB 126 avec une nouvelle augmentation de la densité de près de 195 %. La tendance semble s'inverser lors des expositions au 4-NP avec une diminution de la densité de seulement 40 % par rapport à la seconde génération (Figure 54).

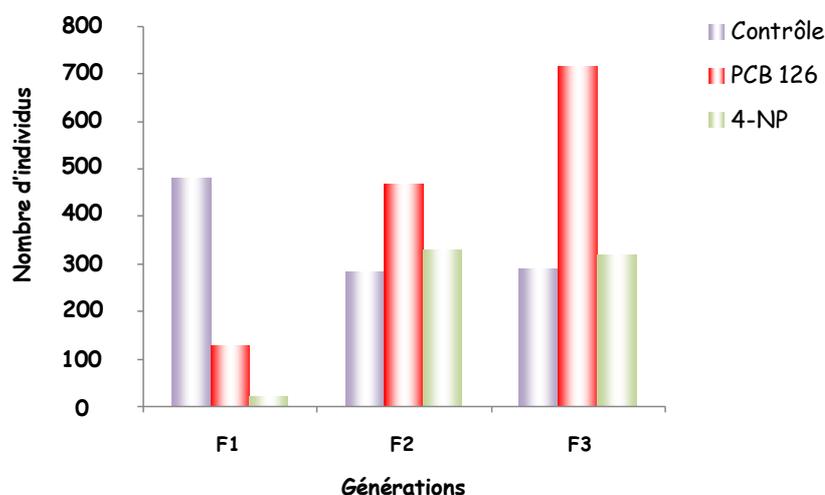


Figure 54 : Nombre d'individus sur 3 générations après exposition à deux contaminants (4-NP, PCB 126) dans un volume donné (densité).

2.6.2. Sex-ratio

Le sex-ratio a été évalué au cours des trois générations successives chez le copépode *E. affinis* (Figure 55). Chez les témoins de la première génération, le sex-ratio est en faveur des mâles (ratio de 1,26). Cette tendance se confirme au cours de la seconde génération avec une augmentation du nombre de mâles de près de 6 % (ratio de 1,34). En revanche, à la troisième génération une majorité des femelles est comptabilisée (ratio de 0,92). Le pattern observé chez les copépodes contaminés est différent. Lors de la première génération le sex-ratio est en faveur des femelles avec des ratios respectifs de 0,70 et 0,80 pour le PCB 126 et le 4-NP. La tendance s'inverse à la seconde génération avec une majorité de mâles pour le PCB 126 (ratio de 1,76), tandis que pour le 4-NP la population gagne un équilibre entre mâles et femelles (ratio de 1). A la troisième génération la tendance se confirme pour le PCB 126 avec une nouvelle augmentation du nombre de mâles. Le nombre de mâles atteint ainsi 2,5 fois le nombre de femelles. Pour le 4-NP, le sex-ratio se stabilise avec un ratio de 0,90 et une population est légèrement en faveur des femelles (Figure 55).

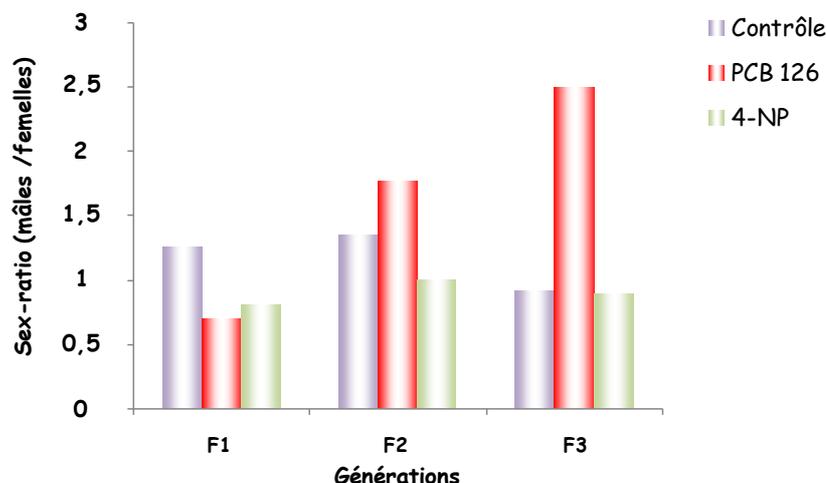


Figure 55 : Evolution du sex-ratio sur 3 générations de copépodes d'*E. affinis* chez les témoins et après exposition à deux contaminants (4-NP, PCB 126).

2.6.3. Longueur du prosome des individus adultes mâles et femelles

Au cours des trois générations successives, des différences significatives ont été observées sur la longueur moyenne du prosome, notamment dans le cadre des expositions

aux contaminants (Figure 56). Chez les témoins la longueur moyenne du prosome est stable au cours des trois générations avec seulement une augmentation de 1 % entre la génération 1 et 2 puis de 2 % entre la seconde et la troisième génération. Pour les copépodes exposés au PCB 126, une diminution non significative de la longueur moyenne du prosome de 7 % a été observée entre la génération 1 et la génération 2. Puis, entre la seconde et la troisième génération cette tendance se confirme avec cette fois-ci une diminution significative de 5 % de la longueur moyenne du prosome entre la seconde et la troisième génération. Dans le cadre des expositions au 4-NP, une diminution significative de la longueur moyenne du prosome de 11 % a été enregistrée entre la première et la seconde génération. Cette tendance s'inverse entre la seconde et la troisième génération avec une augmentation significative de la longueur moyenne du prosome de près de 9 % (aucune différence par rapport au contrôle).

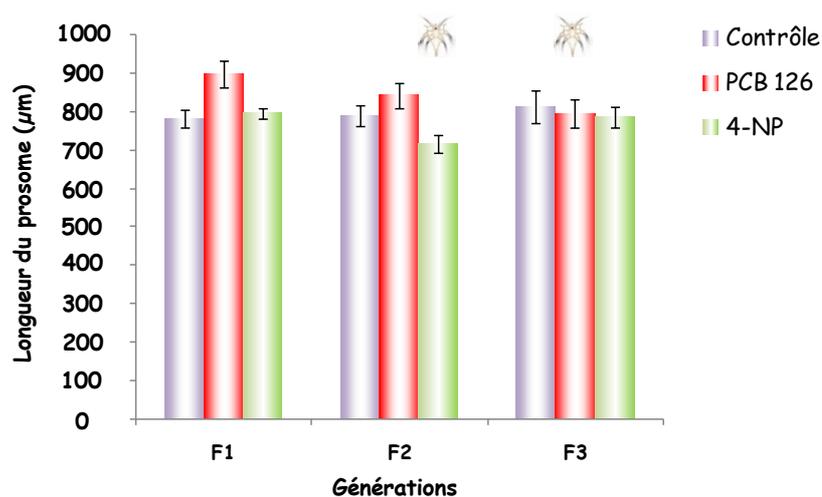


Figure 56 : Evolution de la longueur moyenne du prosome des copépodes au stade adulte d'*E. affinis* sur 3 générations successives chez les témoins et après exposition à deux contaminants (PCB 126 et 4-NP). Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin (kruskal-Wallis ; $p < 0,05$).

2.6.4. Fécondité

La fécondité moyenne a également été enregistrée *via* le nombre d'œufs produits au cours des trois générations successives. Pour les témoins une augmentation significative de la fécondité de 159 % a été observée entre la première génération et la deuxième génération. Cette tendance est confirmée lors du passage à la troisième génération de copépodes, avec une augmentation non significative de près de 40 % de la fécondité (augmentation significative de 200 % significative par rapport à F0). Au contraire, lors des expositions aux deux contaminants, des diminutions significatives de 40 et 60 % ont été rapportées respectivement pour le PCB 126 et le 4-NP dès la deuxième génération de copépodes. Néanmoins au cours de la troisième génération cette tendance se stabilise pour les animaux exposés au PCB126, avec une diminution significative de la fécondité moyenne de 10% Par rapport au témoin. Au contraire, dans le cadre de l'exposition au 4-NP, la fécondité moyenne des femelles d'*E. affinis* augmente de manière significative de 33 % entre la seconde et la troisième génération (Figure 57).

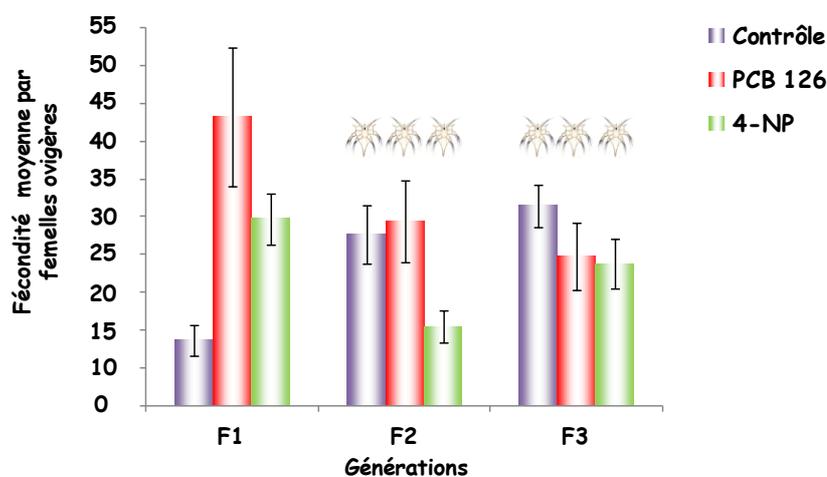


Figure 57 : Evolution de la fécondité moyenne des femelles chez le copépode *E. affinis* au cours de 3 générations successives, après exposition à deux contaminants (4-NP, PCB 126). Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin (Kruskal-Wallis ; $p < 0,05$).

3. Application du test BASIC à une exposition microbienne

Un des objectifs du test BASIC était de tester si des copépodes exposés à un stress chimique chronique étaient plus vulnérables à une colonisation par des bactéries autochtones (exemple : *Vibrio vulnificus*) ou allochtones (exemple : *E. coli*) susceptibles

d'être pathogènes pour l'homme. Dans un premier temps, un protocole de dissociation des bactéries du microbiome des copépodes a été développé, qui a permis d'évaluer le nombre de bactéries cultivables dans les différents compartiments (microbiote total, microbiote interne et microbiote associé à la cuticule). Dans un deuxième temps, il a fallu développer un protocole de colonisation des copépodes préalablement conditionnés pour évaluer les performances du test *BASIC*. Ce travail a été effectué en collaboration avec le groupe de microbiologie de l'UMR M2C.

3.1. Distribution relative des *Vibrio* associés aux copépodes

3.1.1 Optimisation du protocole de dissociation des bactéries

Dans un premier temps, il nous a fallu optimiser le traitement aux ultrasons afin de dissocier le plus grand nombre de bactéries des copépodes (figure 58). Une expérience de dénombrement de la flore chimio-organotrophe aérobique cultivant à 22 °C en fonction du temps de sonication a été réalisée. Les résultats de la figure 58 montrent une abondance maximale à 60 secondes de sonication à 60 Hz.

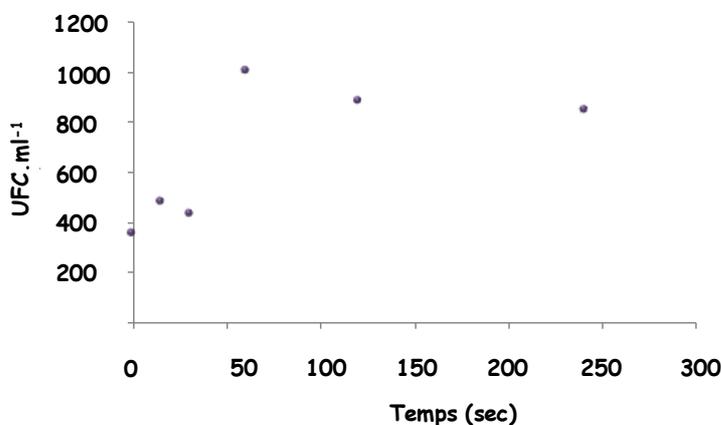


Figure 58 : Dissociation de la flore bactérienne associée aux copépodes (*Eurytemora affinis*) : optimisation du temps de traitement aux ultra sons (20 kHz ; 20W).

En complément une analyse en cytométrie a démontré, à l'issue de traitement, l'absence de bactéries viables associées aux copépodes, et le maintien de l'intégrité des copépodes (UMR M2C).

3.1.2. Distribution relative des *Vibrio sp* associés aux copépodes

Une étude comparative de la densité des *Vibrio sp* cultivant sur milieu TCBS à 22 °C présent dans le microbiote total, microbiote interne et microbiote associé à la cuticule des copépodes a été réalisée (figure 59) pour quatre campagnes de prélèvements (la dissociation des différentes des microorganismes n'a pas pu être réalisée lors la campagne de Mars 2013 suite à une erreur technique).

Sur les trois campagnes l'abondance des *Vibrio sp* cultivant à 22°C sur milieu TCBS varie de 67 à 525 UFC.g⁻¹ de copépodes. Ces *Vibrio* sont majoritairement associés au microbiote interne d'*E. affinis* avec des valeurs de 740, 152 et 474 UFC.g⁻¹ de copépodes pour les mois de mai 2011, février 2012 et mars 2014. Des expérimentations complémentaires de séquençage du gène *rpoD* réalisées au laboratoire de microbiologie de M2C et ont démontré que *Vibrio anguillarum* était l'espèce majoritaire. La souche M2C049 a été sélectionnée pour réaliser le bio-essai BASIC.

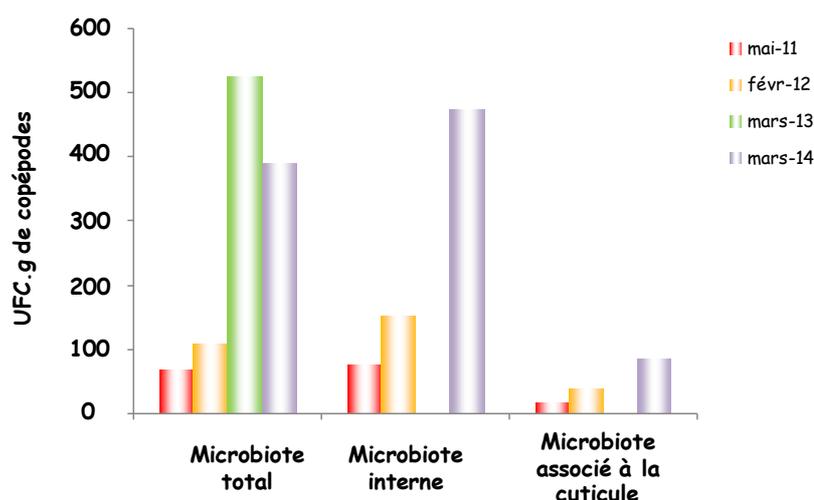


Figure 59 : Distribution relative des *Vibrio* associés aux copépodes.

3.2. Application du bio-essai BASIC à une exposition bactérienne (*Vibrio anguillarum*)

A partir du bio-essai BASIC, nous avons étudié les effets de la colonisation des copépodes *E. affinis* par la souche *Vibrio anguillarum* MC049 sur la croissance et le développement larvaire.

3.2.1. Croissance

Après deux et quatre jours d'exposition aucun effet significatif sur la croissance des nauplii d'*E. affinis* n'a été observé pour les deux concentrations en *Vibrio* (Figure 60 et 61). En revanche, après 6 jours d'exposition une augmentation significative de 20 % de la longueur moyenne du prosome été enregistrée chez les nauplii exposés à la plus forte concentration en *Vibrio* de 10^6 UFC.mL⁻¹ (Figure 62).

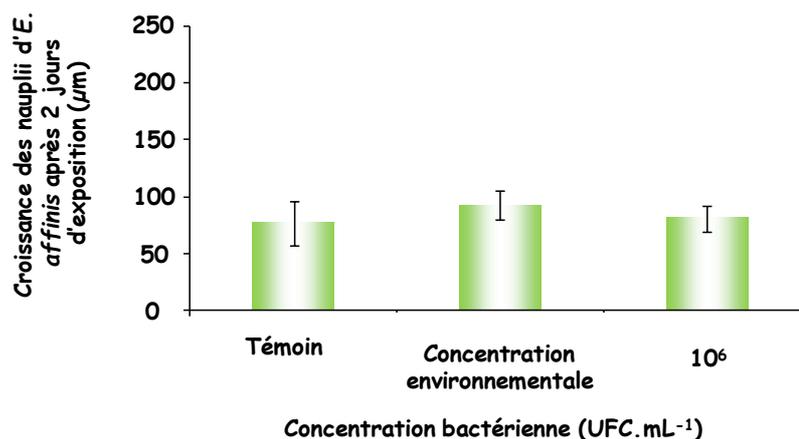


Figure 60 : Croissance larvaire (n= 30-50) lors d'une exposition de 2 jours d'exposition de *Vibrio anguillarum* MC049. Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin (Kruskal-Wallis ; p<0,05).

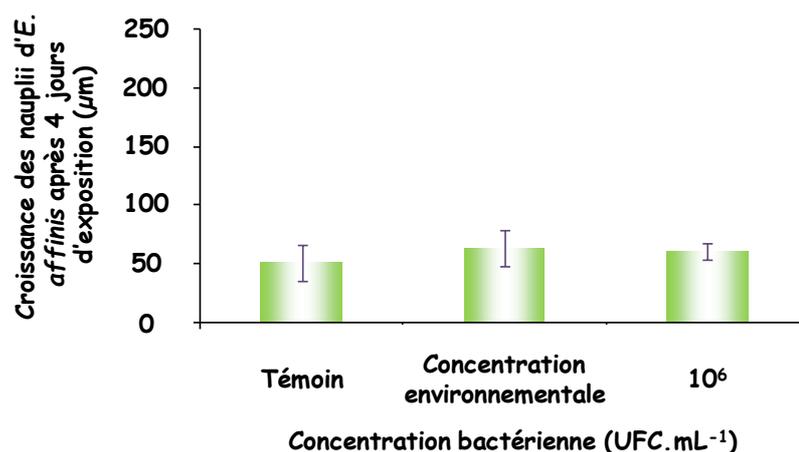


Figure 61 : Croissance larvaire (n= 30-50) lors d'une exposition de 4 jours d'exposition à *Vibrio anguillarum* MC049. Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin (Kruskal-Wallis ; p<0,05).

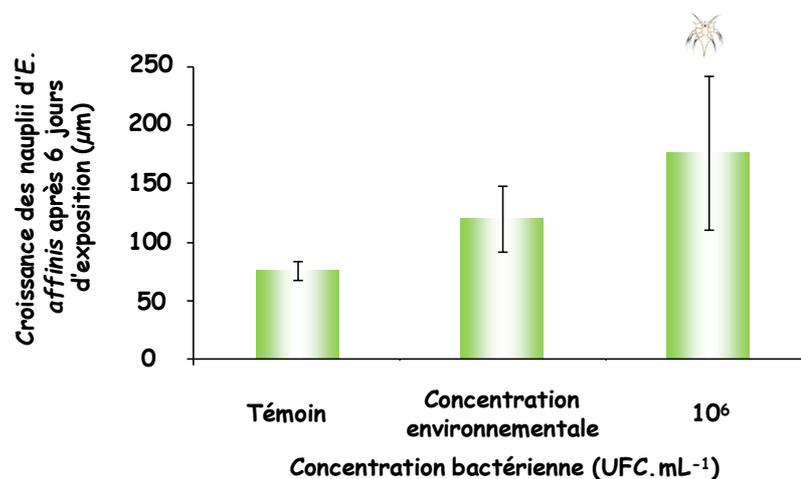


Figure 62 : Croissance larvaire (n= 30-50) lors d'une exposition de 6 jours d'exposition à *Vibrio anguillarum* MC049. Le dessin d'un nauplius indique une différence significative en comparaison avec le témoin (Kruskal-Wallis ; p<0,05).

3.2.2. Activité chitobiase

Au contraire, l'activité chitobiase augmente de 30% après 2 et 4 jours d'exposition alors qu'aucun effet n'est observé après 6 jours d'exposition (Figure 63, 64 et 65).

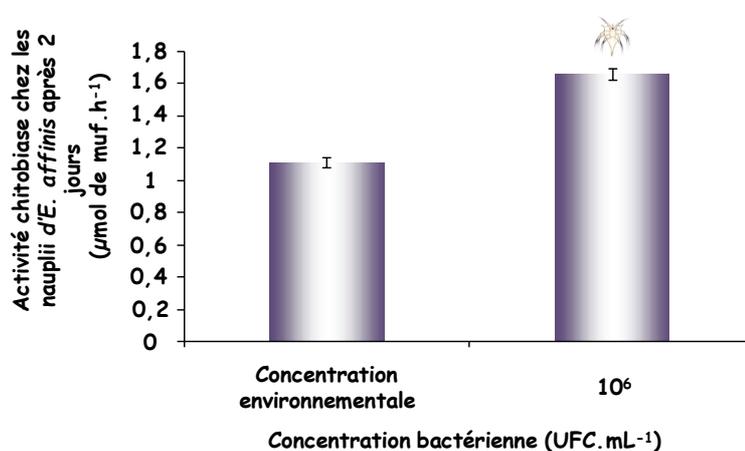


Figure 63 : Activité chitobiase des nauplii d'E. affinis après 2 jours d'exposition à *Vibrio anguillarum* MC049. Le dessin d'un Nauplii indique une différence significative par rapport au témoin (Kruskal-Wallis ; p<0,05).

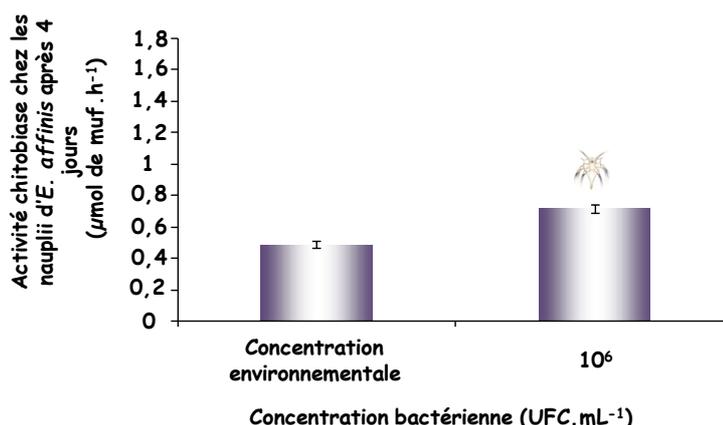


Figure 64 : Activité chitobiase des nauplii d'*E. affinis* après 4 jours d'exposition à *Vibrio anguillarum* MC049. Le dessin d'un Nauplii indique une différence significative par rapport au témoin (Kruskal-Wallis ; $p < 0,05$).

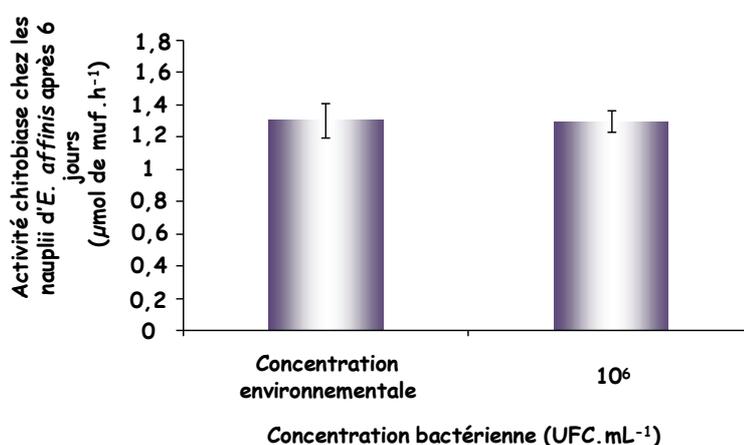


Figure 65 : Activité chitobiase des nauplii d'*E. affinis* après 6 jours d'exposition à *Vibrio anguillarum* MC049. Le dessin d'un Nauplii indique une différence significative par rapport au témoin (Kruskal-Wallis ; $p < 0,05$).

3.2.3. Développement larvaire

Après deux jours d'exposition à une concentration en *Vibrio* de 10^1 UFC.mL⁻¹ 87,5 % des nauplii ont atteint N3 et 12,5 % le stade N4. Des proportions similaires ont été observées à 10^6 UFC.mL⁻¹ avec 82 % des nauplii au stade N3 tandis que 18% sont au stade N4 (Figure 66). Après quatre jours d'exposition, 50 % des nauplii sont au stade N5, 42 % au stade N6 et seulement 8 % ont atteint le stade copépodite lors des expositions à 10^1 UFC.mL⁻¹. En revanche, à une densité bactérienne de 10^6 UFC.mL⁻¹ aucun nauplii n'est encore au stade N5. En effet, 66,6 % des nauplii ont atteint le stade N6 et 33,4 % sont déjà au stade C1 (Figure 67). Après 6 jours d'exposition à 10^1 UFC.mL⁻¹, 36,3 % des nauplii sont

encore au dernier stade nauplien, 54,5 % sont au premier stade copépodite et 9,2 % sont au stade C2. Lors des expositions bactériennes à 10^6 UFC.mL⁻¹, tous les copépodes atteignent la phase copépodite dont 39 % au stade C1 et 61 % au stade C2 (Figure 68).

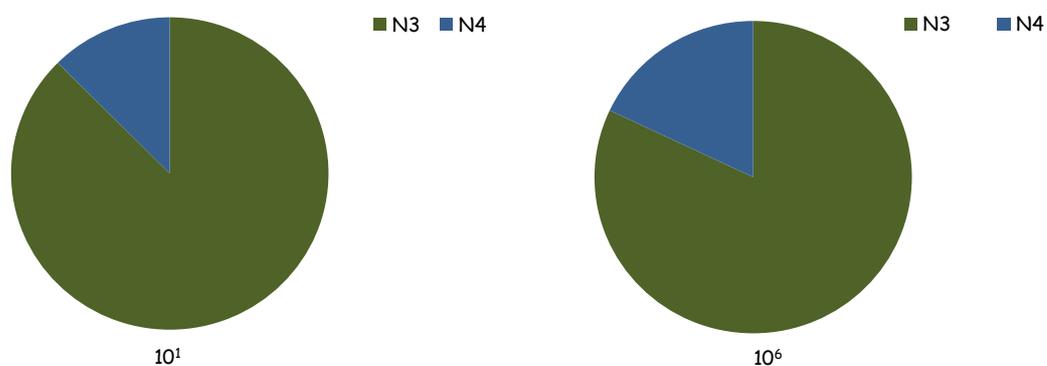


Figure 66 : Répartition des stades larvaires après 2 jours d'exposition à deux concentrations de *Vibrio anguillarum* MC049.

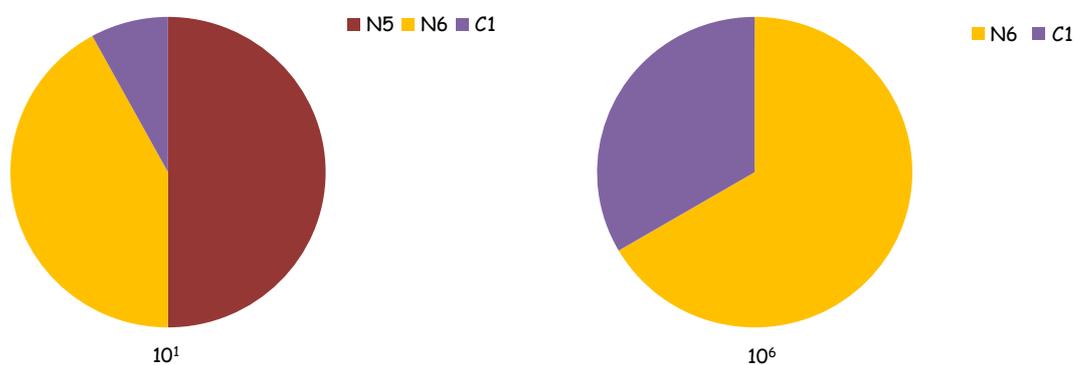


Figure 67 : Répartition des stades larvaires après 4 jours d'exposition à deux concentrations de *Vibrio anguillarum* MC049.

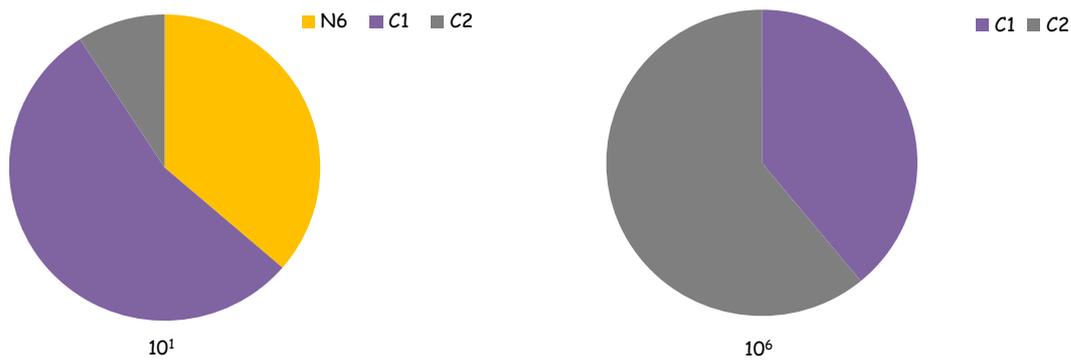


Figure 68 : Répartition des stades larvaires après 6 jours d'exposition à deux concentrations de *Vibrio anguillarum* MC049.

CHAPITRE 4 :

DISCUSSION

L'objectif majeur de ces travaux de thèse a été de développer un bioessai simple, rapide, peu coûteux et sensible sur un trait d'histoire de vie à l'aide du stade larvaire du copépode *E. affinis* appelé *BASIC* (Bioessai croissAncE SurvIE Copépode). Ce bio-essai a tout d'abord été développé sur des éluviats de sédiments enrobés avec des molécules modèles (HAPs, PCBs et APS), puis *BASIC* a été appliqué sur des éluviats de sédiments naturels en provenance de l'estuaire de Seine. Ensuite, les contaminants les plus toxiques (BaP, PCB126 et le 4-NP) ont été choisis pour valider le test *BASIC* dans le cadre d'une contamination uniquement par la voie dissoute. En parallèle, un protocole d'exposition multigénérationnel a été appliqué sur trois générations successives afin de caractériser et de comparer les effets de ces trois composés au bout de trois générations. En complément un protocole d'exposition des copépodes aux bactéries a été mis au point à partir d'une souche de *Vibrio anguillarum* issue du microbiote externe d'*E. affinis* isolé de Seine. L'objectif à terme étant d'appliquer ce bio-essai pour tester la vulnérabilité des copépodes, soumis à un stress chimique chronique, à une colonisation par des bactéries pathogènes. Cette approche repose sur l'utilisation des larves du copépode *E. affinis* au stade nauplien, où le copépode est le plus sensible à la contamination (Barata et al, 2002 ; Guo et al, 2012 ; Green et al, 1996 ; Lotufo & Fleeger, 1997).

Les écosystèmes estuariens, sont des biotopes particuliers soumis aux marées et à une dynamique particulière spécifique. Dans l'embouchure des estuaires macrotidaux fortement anthropisés, comme celui de la Seine, les particules et les contaminants chimiques associés s'accumulent et forment un bouchon vaseux, puis se déposent dans les vasières intertidales. A chaque cycle de marée, en fonction de la force érosive, les sédiments contaminés stockés dans ces vasières sont resuspendus dans la colonne d'eau, constituant alors une source secondaire de contamination. C'est pourquoi, le premier objectif de ces travaux de thèse a été de développer un nouveau bio-essai larvaire sur la croissance, qui mime le phénomène de remise en suspension des contaminants dans la colonne d'eau, avec des éluviats des sédiments enrobés de molécules modèles.

1. Test BASIC (Bioessai croissance Survie Copépode)

Au cours de ces travaux de thèse un nouvel outil a été développé permettant d'évaluer la toxicité des composés hydrophobes en utilisant une voie d'exposition réaliste. Dans les tests préconisés dans le cadre de REACH ou de la DCE figurent les tests sur les copépodes, notamment le test ISO/CD 14669 (1999) avec le copépode marin *Acartia tonsa*, mais l'exposition aux contaminants est opérée uniquement par voie dissoute. Dans le cadre des milieux de transitions comme les estuaires, il est nécessaire de développer des bioessais plus adaptés sur des espèces euryhalines, reflétant les voies de contamination dissoute et particulaire, pour évaluer la toxicité des composés hydrophobes notamment. BASIC a été développé à l'aide d'élutriats de sédiments enrobés avec des molécules modèles issues de différentes classes de contaminants. Tous les composés testés (BaP, PHE, PCB 126, PCB 153, et 4-NP) sont des composés présents en estuaire de Seine (Cailleaud et al, 2007a, b), excepté un composé de synthèse, le DMBA. Ces composés ayant tous la particularité d'être hydrophobes, un bioessai mimant la resuspension des composés dans la colonne d'eau à partir de sédiments enrobés a été développé. BASIC consiste à exposer des nauplii (dès le stade N1) pendant 6 jours à des élutriats de sédiments enrobés et à mesurer par la suite deux types d'effets : létal (taux de survie) et sublétal (taux de croissance).

1.1. Toxicité des HAPs

Les HAPs sont connus comme étant des composés carcinogènes, mutagènes, génotoxiques (Denissenko et al, 1999 ; Chakravarti et al, 2008) et sont toxiques pour la faune en milieu aquatique (Lotufo & Fleeger, 1997 ; Kenish, 1992). La plupart des études concernant la toxicité des HAPs dans ce milieu, utilisent la voie dissoute pour l'exposition à ces composés, et ce malgré leur forte hydrophobicité. Des effets létaux et sub-létaux ont été répertoriés lors d'exposition aux HAPs, chez les vertébrés aquatiques, et notamment chez les poissons. Au niveau individuel, un taux de mortalité de 50% a été enregistré chez le cyprinodon *Cyprinodon variegatus* lors d'une exposition à 0,5 µg.L⁻¹ de DMBA (Hawkins et al, 1991). Parallèlement, des effets sub-létaux au niveau tissulaire, comme des lésions hépatiques ont été observées chez la même espèce lors d'expositions au DMBA dans les mêmes conditions (Hawkins et al, 1991). De nombreux effets sub-létaux interprétables au niveau populationnel, ont également été mis en évidence, chez la truite arc en ciel *Oncorhynchus mykiss*, sur le développement et le comportement à partir d'exposition à

0,21 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de BaP (Hannah et al, 1982), sur la croissance de la rascasse *Sebastes schlegeli* à partir de 1,5 mg.kg^{-1} de BaP (Kim et al, 2008) et sur la reproduction de l'Atlantic croaker *Micropogonias undulatus* à partir de 0,4 mg.kg^{-1} de BaP (Thomas, 1990). Des effets sur le système immunitaire ont été démontrés chez la limande *Limanda limanda* à partir de 4 % (g.g^{-1}) de diesel (Tahir et al, 1993). Des toxicités létales et sub-létales chez les invertébrés, ont été répertoriés lors d'exposition aux HAPs, sur la croissance, le temps de développement, la reproduction, l'alimentation ainsi que sur la respiration. Des CL_{50} après 10 jours d'exposition ont été obtenues chez l'amphipode *Diporeia spp* de 175 et 79,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectivement pour le naphthalène et le pyrène (Landrum et al, 2003). Par ailleurs, des CL_{50} , 48h de 12 ; 8,5 ; 5 ; 10 ; 11 et 8 mg.L^{-1} ont été obtenues respectivement pour les copépodes *Calanus sinius*, *Acartia pacifica*, *Centropages dorsispinatus*, *Euchaeta concinna*, *Labidocera euchaeta* et *Calanopia thompsoni* exposé à l'huile de pétrole (Jiang et al, 2012). Des effets sub-létaux ont été démontrés d'une part, chez les Polychaetes *Streblospio benedictii* Webster et *Capitella sp*, sur la croissance lors d'exposition à l'huile de fuel n°1 (Bridges et al, 1994), et d'autre part sur l'éclosion des œufs et le comportement du crabe *Rhithropanopeus harrisi*, de la moule *Perna viridis* et de la crevette *Palaemonetes pugio* ont été répertoriés (Laughlin et al, 1978 ; Nagarajah et al, 1985 ; Fisher & Foss, 1993). Par ailleurs, une réduction de la consommation d'oxygène à partir de 0,15 mg.L^{-1} et 1,14 mg.L^{-1} de phénanthrène a été enregistrée chez respectivement la moule *Mytilus edulis* et la daphnie *Daphnia pulex* (Donkin et al, 1989 ; Geiger & Buikema, 1981). Une diminution du nombre de jeunes à partir de 0,25 nmol.g^{-1} de fluoranthène a été enregistrés chez les copépodes benthiques *Schizopera knabeni* et *Coullana sp*. (Lotufo, 1998). Certains HAPs sont considérés comme perturbateurs endocriniens (PE), car ils interagissent avec le système endocrinien chez les crustacés. Ainsi, Oberdöster et al (2000) ont mis en évidence que le pyrène altérait de manière significative la mue et la reproduction chez la crevette *Palaemonetes pugio*. La toxicité des HAPs est d'autant plus forte lorsque les invertébrés viennent de muer (Mothershead & Hale, 1992). De récentes études se sont focalisées sur les capacités de bioaccumulation des HAPs, et plus particulièrement chez *E. affinis*. En effet, Cailleaud et al (2007) ont démontré que les HAPs et notamment les composés supérieurs à 3 cycles, comme par exemple le phénanthrène, le BaP et le pyrène étaient particulièrement bioaccumulés chez *E. affinis*, impliquant une forte toxicité relative de ces composés. Les HAPs influent aussi sur l'abondance et le sex-ratio des invertébrés. En effet, Carman & Todaro (1996) ont démontré que les mâles étaient plus sensibles aux HAPs que les femelles

des copépodes *Coullana spp* après 7 jours d'exposition à 27 mg.kg⁻¹ de HAPs. Ce résultats avaient également été observés des années plus tôt et seraient dus à la dépuraton des composés organiques via les œufs chez les femelles (DiPinto et al, 1993 ; Mc Manus et al, 1983). Toutefois, très peu d'études concernant la toxicité des HAPs ont été réalisées avec des sédiments (Swartz et al, 1995 ; Dewitt et al, 1992 ; Suedel et al, 1993 ; Kukkonen & Landrum, 1994 ; Landrum et al, 1994 ; Lotufo & Fleeger, 1997).

Le BaP est un composé présent dans les sédiments de l'estuaire de Seine avec des valeurs de 270 et 1100 µg.kg⁻¹ de masse sèche entre 1995 et 2005 (AESN, 2007). Chez la crevette *P. pugio* un taux de survie de 60 % a été observé lors d'une exposition au BaP à 2100 ng.g⁻¹ de sédiments sec (Wirth et al, 1998), alors qu'aucun effet n'a été observé chez le copépode *Amphiascus tenuirenis* dans les mêmes conditions d'exposition au BaP. Bang et al (2009) ont également démontré une baisse significative de la survie de 45 et 50 % pour des concentrations de 1 et 10 µg.L⁻¹ de BaP chez le copépode harpacticoïde *Tigriopus japonicus*. Le développement des nauplii du copépode *E. affinis* n'est pas affecté par des concentrations de 12 µg.L⁻¹ (Forget-Leray et al, 2005). Ces résultats corroborent ceux obtenus au cours de cette étude où il a été démontré que les éluviats de sédiments contaminés au BaP n'induisaient aucune baisse significative de la survie chez les nauplii du copépode *E. affinis*.

Si la toxicité létale du BaP n'a pas été démontrée, en revanche sa toxicité sub-létale a été enregistrée à des concentrations très faibles. En effet, dans cette étude, une diminution de la croissance a été observée à partir des éluviats de sédiments secs à 142 ng.g⁻¹ de BaP, chez les *nauplii* du copépode *E. affinis*. Ces effets sur la croissance sont également connus dans la littérature. Chez les vertébrés, Winckler et al (1983) ont démontré que le BaP avait un effet sur le développement des larves de poissons du Grunion de Californie *Leuresthes tenuis* à partir de 24 µg.L⁻¹. Chez les invertébrés, plus particulièrement avec les nauplii des copépodes *E. affinis* et *T. japonicus*, Forget-Leray et al (2005) et Bang et al (2009) ont observé un retard du développement à respectivement 12 et 1 µg.L⁻¹ de BaP. Bang et al (2009) ont également démontré que le BaP modifiait le sex-ratio à partir de 0,1 µg.L⁻¹ et diminuait le succès reproducteur à 100 µg.L⁻¹ chez le copépode *T. japonicus*.

Le phénanthrène est un composé très toxique qui s'adsorbe très facilement sur les sédiments (Kow 4,53), c'est pourquoi la majeure partie des études concernant ce composé ont été réalisées à l'aide de sédiments. Dans cette étude, la toxicité létale du PHE a été

observée avec les éluviats de sédiments secs à partir 58 541 ng.g⁻¹ chez les nauplii du copépode *E. affinis*, ces résultats sont similaires à ceux relevés dans la littérature. Peu d'études ont été réalisées sur les vertébrés, en revanche, quelques études ont été réalisées sur des invertébrés et notamment avec des copépodes benthiques. Lotufo & Fleeger (1997) ont démontré les effets du PHE sur la survie des copépodes *Nitroca lacustris* et *Schizopera knabeni* au stade adulte à partir de 514 ng.g⁻¹ de sédiments secs d'une part, et au stade nauplien des CL₅₀ ont été déterminés respectivement à 71 et 84 µg.g⁻¹ de sédiments sec. Ces résultats sont appuyés par d'autres CL₅₀ relevées dans la littérature pour le PHE, 42 µg.L⁻¹ à 48 H chez le copépode *A. tonsa* (Bellas & Thor, 2007), 0,89 et 0,75 mg.L⁻¹ à 96 H chez les copépodes *R. propinqua* et *Quinquelaophonte sp* (Stringer et al, 2012) et 0,522 mg.L⁻¹ à 48 H chez *Oithona davisae* (Barata et al, 2005).

Le PHE a également été recensé comme ayant des effets sub-létaux sur la reproduction et la fécondité, notamment une baisse de la production d'œufs par femelle ovigère chez le copépode *A. tonsa* avec la détermination d'une CE₅₀ à 0,22 µg.L⁻¹ nM (Bellas & Thors, 2007) et une diminution du succès reproducteur à partir de 22 et 90 µg.g⁻¹ de PHE respectivement pour les copépodes *N. lacustris* et *S. knabeni* (Lotufo & Fleeger, 1997). Dans notre étude, un autre effet sublétaux du PHE a été mis en évidence, la croissance des nauplii du copépode *E. affinis*, puisque qu'on observe une diminution significative de celle-ci dès l'exposition aux éluviats de sédiments sec à 297 ng.g⁻¹. De même, Steevens et al (1999) ont rapportés des effets du phénanthrène sur la croissance de l'oursin de mer *Lytechinus variegatus* dès 1µg.L⁻¹. Des effets sur la croissance ont également était enregistrés lors d'études sur des copépodes benthiques. Lotufo & Fleeger (1997), ont démontré que le PHE dès 22 µg.L⁻¹ entraînait chez les nauplii des copépodes *S. knabeni* et *N. lacustris* un retard dans leur développement, sans pour autant bloquer les individus dans ce stade de développement puisqu'ils ont tous atteint le stade copépodite au bout des 10 jours d'exposition. Ce retard dans le développement a également été démontré dans notre étude avec le PHE avec des longueurs moyennes des prosomes inférieures de 30, 33 et 45 % à 297, 6502 et 58541 µg.g⁻¹. Laughlin & Neff. (1979) et Geiger & Buikema. (1992) ont également rapporté des effets du PHE sur le développement larvaire respectivement chez le crabe *Rhithropanopeus harrisi* et la daphnie *Daphnia pulex*.

Le DMBA n'est pas pertinent d'un point de vue environnemental puisqu'il est inexistant dans l'environnement et les sédiments aquatiques Les données bibliographiques sur ce composé sont donc relativement peu répertoriées. Cela étant ce composé de synthèse

possède une forte toxicité. Il est connu pour avoir des effets cytotoxiques, mutagéniques, immunologiques, et c'est un composé très utilisé chez les vertébrés dans les recherches contre le cancer (Miyata et al, 2001). Notamment pour sa capacité à agir *via* le récepteur AhR, et à induire les CYP1A1 et CYP 1B1 (Gálvan et al, 2005). Dans notre étude une forte toxicité est associée au DMBA du fait certainement de la faible métabolisation de ce composé chez les crustacés et donc de sa bioaccumulation. Cependant, chez les vertébrés où les capacités de biotransformation sont importantes, Vicquelin et al (2011) n'ont enregistré aucun effet significatif sur la survie chez les larves du Medaka japonais *Oryzias latipes* après des expositions « sédiment-contact » de 10 jours avec les sédiments modèles enrobés utilisés dans notre étude.

Concernant la croissance, dans notre étude des effets du DMBA ont été observés chez les nauplii du copépode *E. affinis* aux deux plus fortes concentrations *i.e* 6092 et 3606 ng.g⁻¹ de sédiments secs. Les données dans la littérature sur la croissance sont contradictoires. En effet, des études montrent clairement des effets sub-létaux sur la croissance chez les vertébrés et plus particulièrement chez le poisson zèbre *Brachydanio rerio* (Bourne et al, 1973), d'autres études plus récentes montrent l'inverse, notamment sur le medaka japonais *Oryzias latipes* (Rhodes et al, 2005 ; Vicquelin et al, 2011). Aucune données ne sont disponibles sur les crustacés.

1.2. Toxicité des PCBs

Les études sur la toxicité des PCBs sont nombreuses. La plupart concernent les dérivés de l'aroclor et plus particulièrement l'aroclor 1254 (aroclor avec 54 % de chlore). La toxicité létale des PCBs a été rapportée chez les vertébrés et les invertébrés. Notamment, Stalling & Mayer (1972) ont déterminé des CL₅₀, 96 H de 0,28 et 2,74 mg.L⁻¹ chez un poisson, le crapet arlequin *Lepomis macrochirus* exposé à l'aroclor 1248 et 1254. Chez l'amphipode *Gammarus pseudolimnaeus* exposé respectivement à l'aroclor 1242 et 1248, des CL₅₀, 96 H de 10 et 52 µg.L⁻¹ ont été mises en évidence (Eisler, 1986). Chez la crevette *Palaemonestes pugio* une CL₅₀, 96 H de 41 µg.L⁻¹ a été obtenue lors d'exposition à l'Aroclor 1254 (Roesijadi et al, 1976). Chez les copépodes, les effets des PCBs peuvent être différents selon le sexe des individus. Ainsi, DiPinto et al (1993) ont montré une survie plus élevée chez les femelles du copépode *Coullana sp* que chez mâles après une exposition à l'aroclor 1254. Cette différence serait liée à la dépuration possible chez les femelles copépodes, une partie des PCBs serait bioconcentrer dans les œufs et éliminer lors de la ponte (DiPinto et

al (1993) et Mc Manus et al (1983)). Des effets sub-létaux ont également été répertoriés dans le cadre d'exposition aux PCBs chez les vertébrés et chez les invertébrés. Chez les vertébrés, les PCBs sont connus pour interagir avec le récepteur AhR (Aryl hydrocarbon receptor) qui module l'activité de gènes responsables de l'expression d'hormones directement en lien avec la reproduction et le développement (hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes) et peut induire les monooxygénases à cytochrome P450. Des études sur le saumon *Salmo gairdneri* ont démontré ce mécanisme lors d'une exposition à l'aroclor 1254 et 1242 (Franklin et al, 1980). Chez les invertébrés et plus particulièrement chez les crustacés, des PCBs activent le récepteur ECR et modifient ainsi l'expression d'hormones, et la division cellulaire (Oberdöster et al, 1999). De plus, des études ont démontré que les PCBs agissent sur la reproduction, notamment la fertilité des Daphnies du genre *Daphnia magna* après une exposition à $19 \mu\text{g.L}^{-1}$ d'Aroclor 1254 (Maki & Johnson, 1975) et au PCB 52 et 153 (Bernatowicz, 2006). Enfin, des effets sur le déroulement de la mue chez les crustacés ont été rapportés lors d'exposition à des PCBs, notamment chez la daphnie *Daphnia magna*, où des décalages de la croissance ont été observés après des expositions à l'Aroclor 1242 à $0,05$ et $0,10 \text{ mg.L}^{-1}$ (Zou & Fingerman, 1997). Des inhibitions de l'activité chitobiase ont également été observées chez le crabe *Uca pugilator* après exposition à 8 mg.L^{-1} d'Aroclor 1242 (Zou, 2005).

Le PCB 126 est peu présent dans les milieux aquatiques du fait de sa faible rémanence (Pan et al, 2010). La toxicité du PCB 126, s'explique par une interaction avec le récepteur AhR, et le classe ainsi comme PE. Chez les Vertébrés, notamment les larves du Médaka (*Orizias latipes*) (Vicquelin et al, 2011), des effets sur la mortalité et la croissance ont été observés à de faibles concentrations de PCB 126 (37 ng.g^{-1}), sur des sédiments identiques à ceux testés dans nos travaux. Ces résultats vont à l'encontre de ceux de notre étude où aucun effet sur la survie n'a été observé après six jours d'exposition aux éluviats de sédiments enrobés par le PCB 126 chez les nauplii du copépode *E. affinis*. Cependant, chez *Daphnia magna* après trois jours d'exposition, Nakari & Huhtala (2008) ont démontré une toxicité létale du PCB 126 à des concentrations supérieures de l'ordre de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$. Mais, Guo et al (2012) n'ont enregistré aucun effet chez le copépode *T. japonicus* exposé à $600 \mu\text{g.L}^{-1}$ de PCB 126. La toxicité létale du PCB 126 dépendrait particulièrement des capacités de biotransformations et de bio-activations des différentes espèces. Dans cette étude, les effets du PCB 126 sur la croissance des nauplii du copépode *E. affinis* sont incontestables. Les effets sur le développement ont également été démontrés chez les vertébrés, plus

particulièrement, chez le Medaka japonais *Oryzias latipes*, dont les larves exposées à 37 et 88 ng.g⁻¹ de sédiments secs présentent un retard de développement (Vicquelin et al 2011). Chez les invertébrés, notamment les crustacés, des effets sur la croissance ont également été mis en évidence par Zou & Fingerman (1997) qui ont montré un décalage de la mue chez la Daphnie *Daphnia magna*, exposé à 0,05 et 0,10 mg.L⁻¹ de PCB 29 (Dioxin-like).

Le PCB 153 est très présent dans l'environnement, contrairement au PCB 126, il est souvent détectés dans les sédiments aquatiques du fait de sa grande rémanence (Bernhoft et al, 1997 ; van den Berg et al, 1998 ; Skaare, 2001 ; Fangstrom et al, 2002 ; Gladen et al, 2003a, Kunisue et al, 2004 ; Pan et al, 2010). Chez les vertébrés le PCB 153 est le PCB le plus prévalent dans les tissus (Safe, 1994). La toxicité du PCB 153 ne s'explique pas par une interaction avec l'AhR, ni l'ECR. Dans cette étude, aucun effet sur la survie des nauplii n'a été observé après six jours d'exposition aux éluviats de sédiments enrobés au PCB153. Chez le poisson médaka, des résultats concordants ont été enregistrés avec les mêmes sédiments, le PCB 153 n'a pas d'effet sur la survie des larves (Vicquelin et al, 2011). Cependant, des effets létaux ont été observés sur d'autres modèles d'invertébrés, mais ces effets sont tardifs. En effet, Nakari & Huhtala (2008) ont démontré une toxicité létale chez la daphnie *Daphnia magna* exposé à 25 µg.L⁻¹ de PCB 153 (60 % de mortalité).

Aucun effet du PCB 153 sur la croissance des nauplii d'*E. affinis* n'a été observé lors de cette étude. Ces résultats ont également été obtenus chez le Medaka (Vicquelin et al, 2011) avec les mêmes sédiments. En revanche, Zou & Fingerman (1997) ont montré des effets sur la croissance chez *D. magna* lors d'exposition à 0,05 et 0,10 mg.L⁻¹ d'Aroclor 1254.

1.3. Toxicité des Alkylphénols

Les alkylphénols ont été répertoriés comme étant des perturbateurs endocriniens chez les vertébrés (Dreze, 2001) et chez les invertébrés (Oberdöster & Cheek, 2001). Des CL50, 96 H ont été mesurés chez les vertébrés et atteignent 0,135 mg.L⁻¹ chez le vairon à grosse tête *Pimephales promelas* (Holcombe et al, 1984), 1,4 mg.L⁻¹ chez le medaka japonais *Oryzias Latipes* (Yoshimura, 1986), et de 3 mg.L⁻¹ chez la morue atlantique *Gadus morrhua* (Swedmark, 1968). Des effets létaux des alkylphénols ont également été décrits chez les invertébrés. Chez *Daphnia magna*, les valeurs de CL₅₀, 96 H varient de 104 à 738 µg.L⁻¹ (Monsanto, 1985 ; Hüls, 1992 ; Brooke, 1993 ; Comber et al, 1993 ; Zhang et al, 2003). Chez les copépodes, Bechmann (1999) a observé des effets létaux chez les nauplii de *Tisbe*

battagliai exposés à des concentrations de nonylphénol de 125 à 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les alkylphénols et les alkylphénols éthoxylates sont aujourd'hui connus pour leurs effets oestrogéniques, notamment chez les poissons, avec une induction de vitellogénine chez les poissons mâles, qui peut altérer le développement des testicules, le métabolisme des stéroïdes, ainsi que la smoltification (changements physiologiques qui permettent aux poissons anadromes qui vivent en eau douce, de s'adapter à l'eau de mer) et sont responsables de l'apparition d'ovotestis. En estuaire de Seine, le sex-ratio des gobies *Pomatoschistus microps* est modifié avec seulement 38 % de mâles (Minier, 2003 ; Minier et al, 2004). De même, les gardons *Rutilus rutilus* de Seine présentent des modifications du sex-ratio avec une présence de mâles intersexués, et des concentrations de vitellogénine de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ chez les mâles (Minier et al, 2005). Chez les invertébrés des effets similaires apparaissent, des études sur la Daphnie ont montré des altérations du métabolisme de la testostérone, une diminution de la fécondité, une altération du sex-ratio, et des effets sur croissance des organismes (E.U, 2002 ; Servos, 1999). Le 4-NP induit également la Vtg (Vitellogénine) chez les individus mâles de la moule *Mytilus galloprovincialis* à 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et du crabe *Carcinus aestuarii* à partir de 0,1 mg.L^{-1} (Ricciardi et al, 2008). Chez les crustacés, plus particulièrement chez le copépode *E. affinis* des différences de sex-ratio en faveur des mâles dès la seconde génération exposée au 4-NP ont été mis en évidence (Forget et al, 2002).

Le 4-NP est un polluant très représenté dans les environnements aquatiques (Sharma et al, 2009). Dans notre étude, aucun effet sur la survie n'a été observé après six jours d'exposition. Chez les vertébrés, le 4-NP peut induire une mortalité à des concentrations élevées. Vicquelin et al (2011) ont montré un effet sur la survie des larves du medaka japonais *Oryzias latipes* à la plus forte concentration en 4-NP (33349 ng.g^{-1} de sédiments secs). Chez les invertébrés, de récentes études corroborent celles de nos expérimentations. Matozzo et al (2003) ont évalué une CL50 de 1,12 mg.L^{-1} chez le mollusque bivalve *Tapes philippinarum*. Hirano et al (2009) ont démontré que le 4-NP n'avait aucun effet sur la survie des mysidacés *Americanysis bahia* entre 0,3 et 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$. De même, la CL50, 96 H de l'amphipode *Corophium volutator* a été évaluée à 1670 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Brown et al, 1999). Chez les copépodes, l'observation d'effets létaux à de très fortes concentrations confirment ces résultats, avec une CL_{50,96 H} estimée à 38 mg.L^{-1} chez *E. affinis* (Forget-Leray et al, 2005).

En revanche, l'exposition au 4-NP entraîne des effets sublétaux. Chez les vertébrés, le 4-NP ne semble pas affecter la croissance, notamment chez le medaka japonais *Oryzias latipes* (Vicquelin et al, 2011) avec les mêmes sédiments, alors qu'il existe des effets les

invertébrés. Des décalages dans la croissance ont été observés chez le mollusque bivalve *Tapes philippinarum* entre 0,1 et 0,2 mg.L⁻¹, chez l'amphipode *Corophium volutator* à partir de 10 µg.L⁻¹, et chez la moule *Mytilus edulis* à 0,056 mg.L⁻¹ (Matozzo et al, 2003 ; Brown et al, 1999 ; Granmo et al, 1989). De même, Zou & Fingerman (1999 a, b) ont décrit un retard de mue chez le crabe *Uca pugilator* exposé à 10 mg.L⁻¹ de 4-(tert)-octylphénol. Chez la myside *Americamysis bahia* exposé à un mélange de nonylphénol (mélanges d'isomères de 4 cycles), on observe des retards de mue à partir de 30 µg.L⁻¹ et des retards de développement en dessous de 1 µg.L⁻¹ (Hirano et al, 2009). Andersen et al (2001) ont aussi enregistré une inhibition de la mue chez les nauplii du copépode *Acartia tonsa* lors d'exposition au p-octylphénol. Dans cette étude, les effets sur la croissance apparaissent aux concentrations de 8453 et 33349 ng.g⁻¹ de sédiments secs. Ces résultats sont en accord avec des études menées précédemment au laboratoire, où des copépodes exposés à une concentration de 15 µg.L⁻¹ présentaient un blocage des individus au stade nauplien pendant 20 jours avant leur mort, qui s'explique par des interactions au niveau de la mue, essentiel à la croissance des individus Forget et al (2002). Plus récemment, Cailleaud et al, (2007b), a démontré la capacité d' *E. affinis* à bioaccumuler le 4-NP.

1.4. Toxicité des sédiments naturels de l'estuaire de Seine

Après avoir développé un bio-essai larvaire sur des sédiments contaminés avec des molécules hydrophobes, caractéristiques de la contamination de l'estuaire de Seine, le test BASIC a été validé sur des éluutriats de sédiments naturels afin de caractériser la toxicité de ces sédiments.

En 2009, 4 campagnes de prélèvements de sédiments ont été réalisées le long d'un transect amont-aval de l'estuaire de Seine, à différentes conditions hydrologiques: décembre (450 m³.s⁻¹), février, (650 m³.s⁻¹ période de crue), mai (300 m³.s⁻¹) et août (180 m³.s⁻¹ période d'étiage avec formation du bouchon vaseux à l'embouchure). L'analyse des contaminants métalliques des sédiments ne révèle pas de gradient de contamination amont-aval très marqué (excepté à Poses qui reçoit toute la contamination de Paris en période de crue) à l'exception du Baryum (annexe 2.3). Pour les 4 campagnes on observe une contamination stable sur l'ensemble des sites pour le bismuth (25 µg.g⁻¹), le cadmium (1 µg.g⁻¹), le cobalt (5 µg.g⁻¹) et le mercure (1,6 µg.g⁻¹). L'analyse de la contamination des sédiments par les HAPs, les PCBs et les OCPs ne permet pas d'observer un gradient de contamination amont-aval.

Alors que les sites de Caudebec-en-Caux et Poses semblent être les sites les plus impactés par la contamination en HAPs, les concentrations maximales en PCBs et les OCPs, sont observés sur les sites aval du Pont de Normandie et amont de Poses. Ces informations sont en accord avec les résultats obtenus par Fernandes et al (1997) et Narbonne et al (2004) qui ont montré l'absence de relation entre la position des sites le long du transect et la contamination en HAPs, et PCBs. Dans nos travaux, il n'a pas été observé une relation simple entre les effets sur la survie et sur la croissance des copépodes ; et l'origine des sédiments contaminés. En période de crue (février), période où le niveau de contamination chimique de l'estuaire est fortement influencé par les apports amont de l'agglomération parisienne, la survie des nauplii du copépode *E. affinis* est affectée par les éluviats de sédiments des sites amont (Poses et la Bouille). Ces résultats sont en accord avec ceux de la thèse de Ludovic Vicquelin (2011) qui montre une toxicité létale sur des embryons de médaka japonais *Orizias latipes* après exposition à des sédiments des sites amont de l'estuaire (Poses, la Bouille et Oissel). Les effets sur la croissance des nauplii du copépode *E. affinis* diffèrent de ceux observés sur la survie. Ainsi, il n'est pas observé d'effet sur la croissance après exposition aux éluviats de sédiments du site amont en période de crue (Poses), alors que l'exposition à ces sédiments affecte la croissance des larves du médaka japonais (Vicquelin, 2011). En revanche nous observons un effet sur la croissance des copépodes exposés aux sédiments prélevés sur des sites plus aval (Quillebeuf-sur-Seine, Caudebec-en-Caux et la Bouille) en période de crue.

Des expériences en bio-essai survie sur l'amphipode *Corophium arenarium* (Norme ISO 16712) ont aussi montré l'absence de relation entre la position des sites le long du transect et les effets biologiques, révélant une forte toxicité des sédiments prélevés à l'embouchure (Pont de Normandie) (annexes 3.3).

Dans notre étude, les effets sur la survie et la croissance semblent liés aux sites les plus contaminés en HAPs, PCBs et OCPs. Ces résultats sont en accord avec ceux de, Wirth et al (1998) qui ont démontré qu'un mélange de HAPs pouvait réduire la survie de la crevette *Palaemonetes pugio* de 40 %. De même, Bang et al (2009), Forget et al (2005) ont mis en évidence respectivement des effets du BaP sur la survie du copépode *Tigriopus japonicus* et des nauplii du copépode *E. affinis*. Enfin, nous avons démontrés les effets du phénanthrène sur la survie des nauplii du copépode *E. affinis* (Lesueur et al, 2013). Les effets des HAPs sur la croissance ont également été démontrés chez les copépodes (Lotufo, 1998). Concernant les PCBs, des effets sur la survie et la croissance chez les crustacés sont également relevés dans la littérature. Guo et al (2006) ont observé des effets sur la survie du

copéode *Tigriopus japonicus* exposé au PCB 126. Tandis que Zou & Fingerman (1997) ont rapporté des effets de l'aroclor sur la croissance de la daphnie *Daphnia magna*. De plus, lors de la mise au point du test BASIC des effets sur la croissance des nauplii d'*E. affinis* exposé à des éluviats de sédiments enrobés aux PCB 126, ont été observés.

L'effet des OCP sur la croissance a aussi été mis en évidence chez le homard *Homarus americanus* exposé à l'heptachlore (Snyder & Mulder, 2001). De même, Brown et al (2003) ont enregistré des effets sur le développement du copéode *Bryocamptus zschokkei* exposé à 100 µg.L⁻¹ de Lindane. Les résultats obtenus sont cependant plus difficiles à analyser puisqu'ils ne sont pas liés à une seule classe de contaminants mais à un mélange complexe de polluants. Enfin, la toxicité des sédiments semble également liée à leurs propriétés physico-chimiques. En effet, lors de la campagne de février (période de crue) la composition en particules fines (< 63 µm) *i.e* argile et limon des sédiments étaient plus élevée, pour les sédiments les plus contaminés. Ainsi, la proportion plus élevée de particules fines des sites de la Bouille, Poses et Pont de Normandie est un paramètre déterminant pour expliquer les effets observés sur la survie et la croissance d'*E. affinis* exposés à ces sédiments. La taille des particules joue donc un rôle important, les particules les plus fines ayant plus de facilité à adsorber les contaminants, et à se remettre en suspension, à chaque cycle de marée ou lors de phénomènes anthropiques (dragage, batillage).

L'absence de caractérisation des sédiments pour les autres campagnes n'a pas permis de conduire une interprétation similaire des résultats. Toutefois, les résultats des expositions aux sédiments prélevés en décembre, montrent une nouvelle fois une toxicité létale des sédiments du site amont (Poses). Ces résultats confirment l'importante toxicité des sédiments de Poses. La croissance est également affectée lors des expositions avec des sédiments de sites de l'amont de l'estuaire (Poses, Oissel, la Bouille et Caudebec-en-Caux). Vicquelin (2011) avait également mis en évidence une augmentation de la taille des larves à l'éclosion après exposition avec des sédiments prélevés en crue (février), sur le site plus aval (Pont de Normandie, Quillebeuf-sur-Seine et Caudebec-en-Caux). Une des explications pourrait être que les sources d'alimentation, qui joue un rôle crucial dans le développement des copépodes, varient selon la saison notamment entre les mois de février et de décembre. Ainsi, les variations saisonnières des sources de certains contaminants et de l'alimentation peuvent moduler les effets observés sur le temps de développement des crustacés (Torres & Escribano, 2003). Enfin, des isomères différents de certains composés n'induisent pas forcément des effets similaires, expliquant également l'accélération du développement chez

les nauplii du copépode *E. affinis*. Gismondi & Thomé (2014) ont ainsi observé que le PBDE 47 était capable d'accélérer la croissance de l'amphipode *Gammarus pulex* tandis que le PBDE 99 la ralentissait.

Les expositions aux éluutriats des sédiments de Poses prélevés aux mois de mai et d'Août semblent également très toxiques au niveau léthal alors qu'aucun effet sur la croissance des nauplii n'a été observé. Ces travaux mettent donc en évidence une toxicité des sédiments des sites amont plus importante en période de crue (hivernale), marquée par de forts débits et une remise en suspension plus importante des sédiments et des polluants associés. Le phénomène de désorption des contaminants est facilité, par la présence majoritaire de particules fines (Poses, la Bouille) et la présence du bouchon vaseux à l'embouchure (pont de Normandie).

2. Test BASIC - Croissance et développement - Suivi Multigénérationnel

*Après avoir mis au point et validé le bio-essai larvaire respectivement sur des sédiments enrobés avec des molécules modèles et des sédiments naturels en provenance de l'estuaire de Seine, celui-ci a été appliqué avec une exposition aux contaminants par la voie dissoute, à la fois sur des nauplii et sur trois générations d'individus. Le 4-NP et le PCB 126 ont été les deux molécules choisies lors de cette application du fait de leur forte toxicité sub-létale et de leur forte bioaccumulation chez les copépodes *E. affinis*.*

Ces travaux nous ont permis d'étudier la toxicité de composés par la voie dissoute sur des nauplii d'une population de copépode acclimaté au laboratoire d'une part et sur trois générations successives du copépode *E. affinis* d'autre part (protocole d'exposition multigénérationnel précédemment développé par l'équipe de la station marine de Wimereux sous la direction du professeur Sami Soussi). Les concentrations choisies sont les concentrations mesurées précédemment dans la colonne d'eau en estuaire de Seine (Cailleaud et al, 2007 a, b). Les espèces animales dans leur environnement sont soumises à des pressions à la fois naturelles et anthropiques. Les espèces estuariennes sont confrontées plus particulièrement, à des variations permanentes de pH, de salinité, de température et également à des expositions plus importantes à divers contaminants chimiques ou microbiologiques. Des études ont été menées sur différentes espèces estuariennes et ont montré qu'elles étaient douées de modifications phénotypiques (acclimatation) et / ou génotypique (adaptation) en réponse à ces variations extérieures comme par exemple, une

tolérance aux métaux lourds chez différentes espèces végétales et animales a été démontrée au travers de plusieurs générations (Kaweki & Ebert, 2004 ; Morgan et al, 2007). Coors et al (2009) ont mis en évidence une adaptation de l'espèce *Daphnia magna* à un insecticide organophosphoré très employé, le carbamate. Pour finir, Anissa Souissi (2010) a démontré la capacité du copépode *E. affinis* à s'acclimater aux variations de température après plusieurs générations, notamment dans le cadre du changement climatique. Les espèces estuariennes sont donc capables de s'acclimater / s'adapter en réponse à des pressions de sélections, et ces processus permettent de maintenir la survie et le succès reproducteur (*i.e* fitness) des espèces et leur confèrent une meilleure valeur adaptative par rapport aux espèces non résidentes (Kaweki & Ebert, 2004).

2.1. Test BASIC

Le bio-essai larvaire a été appliqué lors d'une exposition par la voie dissoute avec des nauplii de la génération F1 d'*E. affinis*. Les résultats concernant la survie, la croissance et l'activité chitobiase ont été enregistrés tous les deux jours afin de mieux visualiser les variations de ces paramètres. Lors de ces expérimentations, la survie des nauplii n'a pas été impactée par les deux contaminants testés après 2, 4 et 6 jours d'exposition. Ces résultats avaient été observés dans le cadre de la mise au point du bio-essai sur les éluviats de sédiments enrobés à la fois pour le PCB 126 et pour le 4-NP après six jours d'exposition. Par contre, la croissance des nauplii a été ralentie après 2 et 4 jours d'expositions pour les deux contaminants testés, mais ce délai n'est plus observé après six jours d'exposition. Ces résultats sont différents de ceux obtenus avec les éluviats de sédiments enrobés avec ces deux composés, le comportement hydrophobe de ces molécules pourrait expliquer en partie ces résultats. La croissance plus faible des nauplii est appuyée par des niveaux d'activité chitobiase plus faibles. En effet, après 2 et 4 jours d'exposition, une diminution des niveaux d'activité chitobiase a été observée, mais n'est plus enregistrée après 6 jours d'exposition. Plus encore, les niveaux d'activité chitobiase sont bien plus élevés chez les sujets contaminés. Il semblerait donc que la croissance soit corrélée positivement avec les niveaux d'activités chitobiase lors des premières journées d'exposition.

L'évolution des stades de développement a également été prospectée tous les deux jours. Une corrélation positive entre la croissance, les niveaux d'activité chitobiase et le développement a été enregistrée au cours de ces expérimentations. Un retard dans le développement des nauplii a été également enregistré dès les premiers jours de

l'expérimentation, ce qui ne compromet pas le passage de tous les individus aux stades copépodites à la fin du bioessai. Ces résultats tendent à indiquer que les nauplii du copépode *E. affinis* semblent s'acclimater après 6 jours d'exposition. En effet, une activité chitobiase plus forte enregistrée les derniers jours de l'expérimentation montre que l'organisme s'acclimate en accélérant sa mue, ce qui lui permet de franchir avec succès le stade nauplien.

2.2. Suivi Multigénérationnel

La caractérisation des effets trans-générationnels est devenu un enjeu majeur ces dernières années notamment afin d'établir des diagnostics quant aux effets sur le long terme des polluants sur les écosystèmes. Dans ce contexte, Youngson & Whitelaw (2008) s'attachent à dire que l'acclimatation ne dure qu'une génération, généralement, et correspond à une plasticité physiologique, tandis que l'adaptation, provient de modifications génétiques héritées des organismes antérieurs et persiste dans le temps. Les études se sont focalisées au début sur les paramètres abiotiques tels que la température, la salinité et l'acidification par exemple, pour s'attacher par la suite, à la sensibilité des espèces aux polluants, on parle alors de facteur de résistance (FR).

Dans notre étude, la survie a été le premier paramètre étudié. Les résultats montrent une augmentation de la survie au travers des générations, indiquant ainsi que la sensibilité des copépodes semble diminuer au fil des générations lors d'une contamination par le PCB 126 ou par le 4-NP, ce qui laisse supposer une adaptation génétique de l'espèce comme l'indiquait Youngson & Whitelaw (2008). Les études précédentes effectuées sur plusieurs générations de crustacés, se sont principalement focalisées sur les daphnies dans le cadre d'exposition aux métaux. Il apparaît dans ces études une nette amélioration de la sensibilité notamment dans le cadre d'exposition au zinc par exemple avec une diminution de moitié de la sensibilité de la daphnie *Daphnia magna* pré-exposé par rapport au contrôle (Muysen et al, 2002). De plus, Guan & Wang (2006) ont rapporté une meilleure tolérance de la daphnie *Daphnia magna* au cadmium. Les études concernant les Daphnies ont été nombreuses, et finalement, les facteurs de tolérance rapportés ont été mesurés entre 1,4 à 10 pour le cuivre, le zinc et le cadmium (LeBlanc, 1982 ; Bodar et al, 1990 ; Stuhlbacker et al, 1992 ; Muysen & Janssen, 2001a).

Le second paramètre étudié a été la croissance durant trois générations successives. Entre la première et la seconde génération, les copépodes exposés au 4-NP et au PCB 126,

présentent une diminution de la taille du prosome correspondant à une diminution de la croissance. Entre la deuxième et la troisième génération, la longueur du prosome semble se stabiliser dans le cadre des expositions au 4-NP, mais décroît encore pour les expositions au PCB 126. Des études ont été réalisées sur l'évolution du paramètre croissance au cours de plusieurs générations. Notamment, Muysen et al (2002) ont rapporté une amélioration de la croissance d'un facteur 1,2 chez la daphnie *Daphnia magna* pré-exposé au cadmium. Par rapport aux effets observés sur la survie par les mêmes auteurs (facteur 2), la croissance ne semble pas être le paramètre variant le plus dans le cas de pré-exposition. De plus, Brennan et al (2006), ont observé chez la daphnie *Daphnia magna*, une diminution de la mue et donc de la croissance entre la première et la seconde génération dans le cadre d'exposition au 4-NP, alimentant donc nos résultats.

Par la suite, la fécondité a été évaluée sur trois générations. Une diminution de la fécondité a été observée pour les deux contaminants entre la première et la seconde génération. En revanche, seuls les copépodes exposés au PCB 126 connaissent de nouveau une diminution de la fécondité entre la deuxième et la troisième génération. Les résultats recueillis dans la littérature semblent contradictoire. Notamment, Sun et al (2014) ont démontré chez le copépode *Tigriopus japonicus* une augmentation de la fécondité après 3 générations dans le cadre d'exposition au cuivre et après 7 générations dans le cadre d'exposition au tributyl étain. Ces adaptations, apparaissent tardivement, et sont différentes suivant les composés testés. Il aurait été intéressant de continuer les expositions jusqu'à la septième génération afin de pouvoir comparer.

Enfin dans un dernier temps, l'évolution du sex-ratio a été observé. Le sex-ratio ne semble pas évoluer de la même manière dans le cadre des expositions au 4-NP et au PCB 126. En effet, les copépodes exposés au 4-NP ne semblent pas avoir de modification, tandis que dans le cadre des expositions au PCB 126, une très nette modification en faveur des mâles a été observée. Dans la littérature, le 4-NP ne semble pas affecter le sex-ratio chez les crustacés. En effet, des études réalisées sur la daphnie *D. Galeata mendotae* et l'amphipode *Corophium volutator* ne montrent aucune variation dans le sex-ratio (Shurin & Dodson, 1997 ; Brown et al, 1999). Plus généralement, les études montrent que les hormones stéroïdes ne semblent pas affecter le sex-ratio chez les copépodes (Hutchinson et al, 1999 ; Bechmann, 1999).

3. Microbiome – Test Basic et colonisation de *Vibrio*

La chitine est un constituant majeur des écosystèmes aquatiques, avec une production annuelle de près de 80000 tonnes (Subasinghe, 1995 ; Muzzareli, 1977), qui s'explique par la présence d'organismes riches en chitine (10 à 55 % de masse sèche ; Patil et al, 2000). Cependant ce composé nécessite d'être renouvelé (mue) pour permettre la croissance des organismes. Les bactéries sont connues depuis longtemps pour s'associer aux zooplanctons (Barbieri et al, 1999 ; Montanari et al, 1999 ; Colwell, 2000 ; Hervi-O-Heath et al, 2002 ; Jores et al, 2003). Chez les copépodes on observe une symbiose avec les bactéries du genre *Vibrio* qui dégradent la chitine de la cuticule pour assurer leur nutrition, ce qui permet la mue donc la croissance du copépode (Kaneko & Colwell., 1975 ; Dumontet et al, 1996 ; Vezulli et al, 2008 ; Turner et al, 2009). L'association des bactéries aux zooplanctons est bénéfique à la croissance des bactéries en milieu aquatique (Huq et al, 1983 ; Carli et al, 1993 ; Colwell, 2000 ; Maugeri et al, 2004 ; Baffone et al, 2006). Ainsi la symbiose entre les *Vibrio* et les copépodes permet d'assurer leur nutrition tout en conférant une meilleure tolérance aux stress environnementaux, notamment aux composés chimiques (Mc Carthy & Miller, 1994), aux modifications de pH (Nalin et al, 1979), et aux modifications de températures (Amako et al, 1987).

L'association entre les bactéries et le zooplancton se déroule en plusieurs étapes : une première étape de repérage de leurs hôtes grâce au chimiotactisme (Bowen et al, 1993 ; Jackson, 1989), une seconde étape d'association basée sur la reconnaissance spécifique de lectine (Mirelman, 1986), puis la formation d'un biofilm microbien appelé aussi microbiote externe (Cooksey & Wigglesworth-Cooksey, 1995). Différentes classes de chitinase et chitobiase ont été caractérisées (Zeichmeister & Toth., 1939 ; Zeichmeister et al, 1939 ; Zakikas, 1984 ; Wood et al, 1992 ; Flach et al, 1992 ; Renkema et al, 1995 ; Cohen-Kupiec & Chet., 1998 ; Hamel et al, 1997). Plus récemment, il a été démontré que chez les bactéries du genre *Vibrio* la dégradation de la chitine impliquait une cinquantaine de gènes dont l'expression était régulée par un système à deux composants (sensor/kinase). La protéine sensor CBP (chitinase binding protein) est une protéine membranaire qui permet la fixation de la chitine (Vezulli et al, 2008).

Les bactéries du genre *Vibrio* sont des bactéries autochtones en estuaire de Seine. Elles sont donc naturellement présentes dans le milieu naturel des copépodes *E. affinis*. Lors de nos travaux, nous avons observé que *Vibrio anguillarum* était l'espèce de *Vibrio*

(cultivant à 22 °C sur milieu TCBS) majoritairement retrouvée dans le microbiote des copépodes *E. affinis*. Plus particulièrement, il a été observé une association des *Vibrio* à la fois au microbiote interne et également sur la cuticule (microbiote externe) des copépodes. Ces résultats sont en accord avec ceux de Dumontet et al (1996) qui ont décrit une association de *Vibrio* au niveau des segments thoraciques et des appendices de plusieurs espèce de copépodes dont *Temora stylifera*, *Centropages typicus* et *Pracalanus parvus*. L'abondance bactérienne diffère selon les saisons, avec une abondance maximale en période hivernale (Dumontet et al, 1996). De même dans nos travaux, l'abondance des *Vibrios* associés aux copépodes est plus importante en hiver. Dans notre étude la majorité des *Vibrio* sont associées au microbiote interne d'*E. affinis*. La présence de bactéries dans le microbiote interne des copépodes avait aussi été décrite dans la bibliographie (Jing et al, 2012 ; Hansen et al, 1996 ; Hansen & Bech, 1996).

L'effet positif de la colonisation des copépodes par *Vibrio* a été démontré par le bio-essai BASIC. Dans notre étude, il a été mis en évidence une augmentation de l'activité chitobiase après 2 jours d'exposition à la concentration la plus élevée en *Vibrio*. Cette augmentation de l'activité chitobiase s'est traduite par une augmentation de la croissance et un passage successif des stades plus rapide les derniers jours de l'expérimentation. Il en résulte donc que la présence de *Vibrio* améliore les capacités la croissance du copépode *E. affinis*. Dans la littérature, il a été démontré que les biofilms microbiens amélioreraient aussi les capacités de reproduction et de développement des vertébrés. Ainsi, Munro et al (1995) ont observé une nette amélioration de la croissance chez les larves de turbot en présence de biofilms naturels. Chez les crustacés, la présence de biofilm microbien favorise le développement, et la reproduction chez le copépode *Shizopera sp*, ainsi que la productivité chez *E. affinis* (Hans-Uwe Dahms et al, 2007 ; Heinle et al, 1977).

CHAPITRE 5 :

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Conclusion générale

Les travaux réalisés au cours de cette thèse font suite à toute une série d'expérimentations réalisées sur le copépode *E. affinis* en estuaire de Seine. Dans un premier temps, il a été démontré que les APs, les HAPs et les PCBs sont retrouvés à des niveaux de concentrations importants dans la phase particulaire de l'estuaire de Seine (de quelques ng à des centaines de $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de particules). D'autre part, il a été mis en évidence un transfert important de ces contaminants chez *E. affinis*. Pourtant, cette contamination ne semble pas avoir d'effet sur la démographie de ce copépode qui possède une biomasse en estuaire de Seine plus importante que dans n'importe quel autre estuaire. Cette forte densité, peut s'expliquer par la faible densité et variété des prédateurs d'*E. affinis* en estuaire de Seine, et également par une différence de tolérance aux contaminants sur une génération (acclimatation) ou plusieurs générations (adaptation). C'est pourquoi l'objectif du projet COBAC était d'évaluer les processus d'acclimatation et / ou d'adaptation du copépode *E. affinis* soumis à un stress chimique et / ou microbiologique.

Le premier objectif de ces travaux de thèse était de développer un bio-essai larvaire (stade le plus sensible) basé sur la croissance du copépode *E. affinis*. Le bio-essai a été validé en deux étapes. Dans un premier temps, ce bio-essai a été mis au point sur des éluviats de sédiments (phase particulaire et dissoute) enrobés avec des molécules modèles représentatives d'une classe de contaminants en estuaire de Seine à savoir un AP (4-NP), trois HAPs (BaP, DMBA, PHE) et deux PCBs (PCB 126, PCB 153). Cette mise au point a permis de mettre en évidence (i) les effets sur la croissance de ces composés et (ii) la sensibilité du paramètre croissance chez le copépode *E. affinis*. Dans un second temps, ce bio-essai a été validé sur des sédiments naturels prélevés le long du transect amont-aval en estuaire de Seine pendant deux périodes de crues (février et décembre) et deux périodes d'étiages (mai et août). Cette validation a permis de mettre en évidence la toxicité des sédiments naturels de l'estuaire de Seine chez les nauplii du copépode *E. affinis*. Il a aussi été démontré que la toxicité des sédiments n'était pas plus élevée à l'amont de l'estuaire qu'à l'aval, mais que cette toxicité dépendait plus particulièrement de la taille des particules ($<63 \mu\text{m}$) ainsi que des concentrations en contaminants, avec le site de Pose qui constitue le déversoir du bassin Parisien. Enfin, il a été mis en évidence une toxicité plus forte en période de crue associée à deux phénomènes, d'un part un débit plus fort permettant une resuspension plus aisée des polluants et d'autre part aux pics de contaminations mesurés généralement en périodes hivernales.

La seconde phase de ces travaux de thèse a consisté à appliquer le bio-essai « BASIC » en phase dissoute sur deux contaminants retenus *i.e* le 4-NP et le PCB 126, à la fois sur les nauplii de la génération F1 et sur trois générations successives de copépodes (F1, F2 et F3) afin de mettre en évidence respectivement les capacités d'acclimation et d'adaptation d'*E. affinis* à un stress chimique.

Ces travaux ont pu mettre en évidence les capacités d'acclimation des nauplii d'*E. affinis* après 6 jours d'exposition notamment grâce au développement d'un nouveau marqueur : l'activité chitobiase. Les résultats ont démontré que les nauplii investissaient leur énergie dans le maintien du fitness avec une activité chitobiase supérieure chez les organismes contaminés afin de maintenir leur croissance et le passage successif des différents stades nécessaire à la survie de ces organismes.

En parallèle, ces travaux ont mis en évidence les capacités d'acclimation des copépodes au cours du suivi de trois générations successives, plus particulièrement sur la survie, la croissance et la fécondité. Toutefois, les copépodes semblent s'adapter d'avantage à la contamination au 4-NP, composé reconnu comme étant mieux métabolisé chez les copépodes, qu'aux PCBs. Cette étude marque donc un lien fort entre les capacités de bioaccumulation / métabolisation et d'acclimation / adaptation du copépode *E. affinis*.

Enfin, dans un troisième temps, ces travaux se sont intéressés aux populations bactériennes associées au copépode *E. affinis* en estuaire de Seine et leurs effets sur la croissance.

Il a été mis en évidence lors de ces travaux que le copépode *E. affinis* était essentiellement colonisé par les bactéries du genre *Vibrio anguillarum*, bactérie autochtone de l'estuaire de Seine. De plus, *Vibrio anguillarum* a été retrouvé à la fois associé au microbiote interne et au microbiote externe (chitine) d'*E. affinis*.

Les travaux préliminaires sur les effets d'une exposition des nauplii du copépode *E. affinis* aux bactéries *Vibrio anguillarum* ont démontré une absence d'effet sur la survie des copépodes. En revanche, une exposition à *Vibrio anguillarum* de 6 jours semblent améliorer la croissance du copépode *E. affinis*. Ces observations sont en adéquation avec l'augmentation de l'activité chitobiase observé après deux et quatre jours d'exposition. Il est nécessaire de mettre en œuvre d'autres expériences pour étudier le rôle de la colonisation *Vibrio anguillarum* du copépode *E. affinis* en estuaire de Seine, il est probable que cette interaction soit profitable aux deux organismes. D'un côté, le copépode *E. affinis* améliore la survie de *Vibrio sp* face aux contaminants, de l'autre côté le rôle de recyclage du carbone par les bactéries pourrait aider à la croissance du copépode.

Perspectives

Trois axes de recherche restent principalement à poursuivre.

L'association des bactéries autochtones en estuaire de Seine, notamment *Vibrio sp.*, ne semble pas avoir d'effet sur la survie du copépode *E. affinis*, bien au contraire, il semblerait que cette association aide à son développement. Mais qu'en est-il au niveau cellulaire, quel est l'impact de cette interaction au niveau immunitaire ? Afin d'approfondir les réponses immunitaires lors d'interaction bactéries-copépodes, un nouveau marqueur de l'immunité pourrait être développé. La molécule centrale de l'immunité chez les crustacés est la prophénoloxydase (ProPO). Cette molécule est active sous la forme phénoloxydase (PO), et joue un rôle central dans l'immunité non spécifique chez les crustacés, en permettant notamment la libération de radicaux oxygénés (réactions oxydantes) et de macrophages (réactions de phagocytoses).

Le suivi de trois générations successives de copépodes face à un stress chimique a donné des résultats encourageants dans la compréhension des processus d'acclimatation / adaptation de cette espèce estuarienne. Afin d'approfondir ces mécanismes d'acclimatation / adaptation, de nouvelles séries d'expérimentations multi-générationnelles pourraient être menées dans le cadre d'exposition à *Vibrio sp.* Les effets létaux, et sub-létaux (croissance, sex-ratio et fécondité) sur les copépodes pourraient être alors élucidés. Ces expérimentations permettraient notamment de mettre en évidence les relations étroites entre les copépodes et les bactéries.

Enfin, afin de mieux comprendre les mécanismes d'acclimatation / adaptation du copépode *E. affinis* en estuaire de Seine, de nouvelles séries d'expérimentations pourraient être menées, plus particulièrement des contaminations conjointes associant à la fois un stress chimique et une colonisation bactérienne avec des bactéries pathogènes d'origine autochtone (*Vibrio vulnificus* ou *Vibrio parahaemolyticus*) ou bactéries potentiellement pathogènes d'origine allochtone (*Escherichia coli*). Il permettrait d'évaluer si des copépodes exposés à une contamination chimique chronique est plus vulnérable à une colonisation par des bactéries pathogènes en milieu estuarien.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abarnou A., Burgeot T., Chevreuril M., Leboulenger F., Loizeau V., Madoulet-Jaouen A. & Minier C., 2000. Les contaminants organiques: quels risques pour le monde vivant? Editeur Ifremer. Fascicule 13, Programme Seine-Aval, 35 pp.

Adams S.M., Shepard K.L., Greeley M.S., Jimenez B.D., Ryon M.G., Shugart L.R., McCarthy J.F., Hinton D.E., 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Mar. Environ. Res.* 28, 459-464.

Agence de l'Eau Seine Normandie & Direction Départementale de l'Équipement de Seine-Maritime, 2007. Réseau National de Bassin, Banque Qualité des Eaux.

Agences de l'eau, 1999. Système d'évaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau. SEQ-eau. Rapport de présentation, grille de seuils par altération avec justification. Grilles de seuil par usage et fonction. Principes généraux, Etude Inter-Agence n°64.

Agency for Toxic Substances & Disease Registry, Department of Health and Human Services, 2006. Toxicological profiles for hazardous substances. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>

Allan J. D., Daniels R. E., 1982. Life Table evaluation of chronic exposure of *Eurytemora affinis* (Copepoda) to Kepone. *Mar. Biol.* 66, 179-184.

Amako K., Shimodori S., Miake S., Umeda A., 1987. Effects of chitin and its soluble derivatives on survival of *Vibrio cholerae* O1 at low temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 603-605.

Andersen H.R., Wollenberger L., Halling-Sorensen B., Kusk K.O., 2001. Development of copepod *nauplii* to copepodites a parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2821-2829.

Ankley G.T., Peterson G.S., Lukasewycz M.T., Jensen D.A., 1990. Characteristics of surfactants in toxicity identification evaluation. *Chemosphere* 21, 3-12.

Araujo G.S., Moreira L.B., Morais R.D., Davanzo M.B., Garcia T.F., Cruz A.C., Abessa D.M., 2013. Ecotoxicological assessment of sediments from an urban marine protected area (Xixová-Japuá State Park, SP, Brazil). *Mar. Pollut. Bull.* 75, 62-68.

ASTM., 1992. Standard guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods (includes annexes on procedures for following organisms : *Ampelisca abdita*, *Eohaustorius estuarius*, *Grandidierella japonica*, *Leptocheirus plumulosus* and *Rhepoxinius abronius*). In. ASTM, 1993, Annual Book of Standards, 11.04, E1367-92. American Society for Testing and Materials, Philadelphia,

Atkinson A., 1996. Subantarctic copepods in an oceanic, low chlorophyll environment: Ciliate predation, food selectivity and impact on prey populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 130, 85-96.

Avila T.R., Machado A.A.S., Bianchini A., 2011. Chitobiase of planktonic crustaceans from South Atlantic coast (Southern Brazil). Characterization and influence of abiotic parameters on enzyme activity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 407, 323-329.

- Baffone W., Tarsi R., Pane L., Campana R., Repetto B., Mariottini G.L., Pruzzo C., 2006. Detection of free-living and plankton-bound *vibrios* in coastal waters of the Adriatic Sea (Italy) and study of their pathogenicity-associated properties. *Environmental Microbiology* 8, 1299-1305.
- Bang H.W., Lee W., Kwak I-S., 2009. Detecting point as developmental delay based on the life-history development and urosome deformity of the harpacticoid copepod, *Tigriopus japonicus sensu lato*, following exposure to benzo(a)pyrene. *Chemosphere* 76, 1435-1439.
- Barata C., Baird D.J., Medina M., Albalat A., Soares A.M.V.M., 2002. Determining the ecotoxicological mode of action of toxic chemicals in meiobenthic marine organisms: stage-specific short tests with *Tisbe battagliai*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 230, 183-194.
- Barata C., Calbet A., Saiz E., Ortiz L., Bayona J.M., 2005. Predicting single and mixture toxicity of petrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons to the copepod *Oithona davisae*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2992-2999.
- Barbieri E., Falzano L., Fiorentini C., Pianetti A., Baffone W., Fabbri A., Matarrese P., Casiere A., Katouli M., Kuhn I., Mollby R., Bruscolini F., Donelli G., 1999. Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio spp.* and non-01 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2748-2753.
- Baumard P., Budzinski H., Michon Q., Garrigues P., Burgeot T., Bellocq J., 1998. Origin and bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from mussel and sediment records. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 47, 77-90.
- Bechman R.K., 1994. Use of life tables and LC50 tests to evaluate chronic and acute toxicity effects of copper on the marine copepod *Tisbe furcata* (Baird). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1500-1517.
- Bechmann, R. K., 1999. Effect of the endocrine disrupter nonylphenol on the marine copepod *Tisbe battagliai*. *The Science of the Total Environment* 233, 33-46.
- Becue A., Ngyen R., 2005. Etude de l'analyse des alkylphénols, *Rapport final INERIS*, 34 p.
- Bejarano A.C., Chandler G.T., 2003. Reproductive and developmental effects of atrazine on the estuarine meiobenthic copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 3009-3016.
- Bellas J., Thor P., 2007. Effects of selected PAHs on reproduction and survival of the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology* 16, 465-474.
- Ben Radhia-Souissi A., 2010. Étude de la plasticité reproductive et de la morphologie d'un copépode estuarien : comparaison intercontinentale. Thèse de doctorat, Université Sciences et Technologies Lille1. 224 p.
- Bengtsson B-E., Tarkpea M., 1995. A 96-h acute toxicity test with the brackish water crustacean *Nitocra spinipes*. Assesment of chemicals products and effluents. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 10, 147-150.

- Bernatowicz P. & Pijanowska J., 2011. Daphnia response to biotic stress modified by PCBs. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 74, 711-718.
- Bernatowicz P., 2006. Phenotypic plasticity and developmental noise in *Daphnia longispina* group. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie.* 29, 1535-1538.
- Bernhoft A., Wiig O., Skaare J.U., 1997. Organochlorines in polar bears (*Ursus maritimus*) at Svalbard. *Environ. Pollut.* 95, 159-175.
- Bessi H., El Alami., 2009. Les bio-essais dans l'évaluation d'impact des polluants sur les écosystèmes dulçaquicoles. *Les techniques de laboratoires* 4, 22p.
- Birnbaum L. S., 1985. The role of structure in the disposition of halogenated aromatic xenobiotics. *Environ Health Persp.* 61, 11-20.
- Bodar C.W.M., van der Sluis I., van Montfort J.C.P., Voogt P.A., Zandee D.I., 1990. Cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 16, 33-40.
- Bourne E.W., Jones R.W., 1973. Effect of 7,12 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) in fish cells *in vitro*. *Transactions of American Microscopical Society* 92, 140-142.
- Bowen J.D., Stolzenbach K.D. & Chisholm S.W., 1993. Simulating bacterial clustering around phytoplankton cells in a turbulent ocean. *Limnol. Oceanogr.* 38, 36-51.
- Boxshall G.A., Halsey S.H., 2004. An introduction to copepod diversity. Ray Society Eds 166, 966p.
- Bradley B.P., 1986. Genetic expression of temperature tolerance in the copepod *Eurytemora affinis* in different temperature and salinity environments. *Mar. Biol.* 91, 561-565.
- Breitholtz M., Wollenberger L., 2003. Effects of three PBDEs on development, reproduction and population growth rate of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Aquat. Toxicol.* 64, 85-96.
- Brennan S.J., Brougham C.A., Roche J.J., Fogarty A.M., 2006. Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 64, 49-55.
- Bridges T.S., Levin L.A., Cabrera D., Plaia G., 1994. Effects of sediment amended with sewage, algae, or hydrocarbons on growth and reproduction in two opportunistic polychaetes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 177, 99-119.
- Bringman G., Kuhn R., 1982. Results of toxic action of water pollutants on *Daphnia magna* tested by an improved standardised procedure. *Zeitschrift für Wasser und Abwasser Forschung* 15, 1-6.
- Brooke L.T., 1993. Acute and chronic toxicity of nonylphenol to ten species of aquatic organisms. Report to the US Environmental Protection Agency, Duluth, MN (contract no. 68-C1-0034). Lake superior Research Institute, University of Wisconsin-Superior, Superior, WI.
- Brown R. J., Rundle S. D., Hutchinson T. H., Williams T. D., Jones M. B. 2003. A copepod life-cycle test and growth model for interpreting the effects of lindane. *Aquat. Toxicol.* 63, 1-11.

Brown R.J., Conradi M., Depledge M.H., 1999. Long-term exposure to 4-nonylphenol affects sexual differentiation and growth of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766). *Sci. Total Environ.* 233, 77-88.

Budzinski H., Augagneur S., LeMenach K., Togola A., Lardy S., 2006. Nouvelles classes de contaminants de l'estuaire de Seine : alkylphénols, hormones stéroïdiennes, antibiotiques, analgésiques et hypolémiantes. *Rapport Seine Aval 2005*, thème 1, 31 p.

Budzinski H., Letellier S., Thompson M., LeMenach K., Garrigues P., 2006. Combined protocol for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBs) from the sediment using focused microwave assisted (FMW) extraction at atmospheric pressure. *Fresenius J. Anal. Chem.* 367, 163-171.

Burton G.A., 1992. Sediment toxicity assessment. Lewis Publishers, London, 211p.

Butler P.A., Lowe J.I., 1978. Flowing sea water toxicity tests using oyster (*Crassostrea virginica*). *In* Bioassay Procedures for the Ocean Disposal Permit Program, EPA-600/9-78-010, 25-27.

Cachot J., Geffard O., Augagneur S., Lacroix S., Le Menach K., Peluhet L., Couteau J., Denier X., Devier M.H., Pottier D., Budzinski H., 2006. Evidence of the genotoxicity of related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandie, France). *Aquat. Toxicol.* 79, 257-267.

Cachot J., Law M., Pottier D., Peluhet L., Norris M., Budzinski H., Win R., 2007. Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the transgenic Medaka. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7830-7836.

Cailleaud K., 2006. La qualité de l'eau en estuaire de Seine - Analyse pluridisciplinaire de la contamination organique via l'utilisation du modèle animal *Eurytemora affinis* - Etude *in situ* et expérimentale. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, Bordeaux, 220 p.

Cailleaud K., Budzinski H., Lardy S., Augagneur S., Barka S., Souissi S., Forget-Leray J., 2011. Uptake and elimination, and effect of estrogen-like contaminants in estuarine copepods: an experimental study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, 226-236.

Cailleaud K., Budzinski H., Le Menach K., Souissi S., Forget-Leray J., 2009. Uptake and elimination of hydrophobic organic contaminants in estuarine copepods: an experimental study. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 239-246.

Cailleaud K., Budzinski H., Pehulet L., LeMenach K., Souissi S., Forget-Leray J., 2009. Influence of a tidal cycle on sediment resuspension and on the bioavailability and toxicity of hydrophobic organic contaminants in the water column of the Seine Estuary. *Environ. Pollut.* 157, 64-71.

Cailleaud K., Forget-Leray J., Souissi S., Hilde D., LeMenach K., Budzinski H., 2007a. Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïda, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70, 270-280.

Cailleaud K., Forget-Leray J., Souissi S., Lardy S., Augagneur S., Budzinski H., 2007b. Seasonal variation of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine

Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïd, copepod). Part 2: Alkylphenol-polyethoxylates. *Chemosphere* 70, 281-287.

Cailleaud K., Maillet G., Budzinski H., Souissi S., Forget-Leray J., 2006. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). *Comp. Biochem. Phys. A* 147, 841-849.

Cailleaud K., Michalec F.G., Forget-Leray J., Budzinski H., Hwang J.S., Schmitt F., Souissi S., 2011. Changes in the swimming behavior of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) in response to a sublethal exposure to nonylphenols. *Aquat. Toxicol.* 102, 228-231.

Calbet A., Carlotti F., Gaudy R., 2007. The feeding ecology of the copepod *Centropages typicus* (Kröyer). *Progress in Oceanography* 72, 137-150.

Carli A., Pane L., Casareto L., Bertone S., Pruzzo C., 1993. Occurrence of *Vibrio alginolyticus* in Ligurian coast rock pools (Tyrrhenian Sea, Italy) and its association with the copepod *Tigriopus fulvus* (Fisher 1860). *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1960-1962.

Carman R.K., Todaro A.M., 1996. Influence of polycyclic aromatic hydrocarbons on the meiobenthic-copepod community of a Louisiana salt marsh. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 198, 37-54.

Castro H., Ramalheira F., Quintino V., Rodrigues A.M., 2006. Amphipod acute and chronic sediment toxicity assessment in estuarine environmental monitoring: an example from Ria de Aveiro, NW Portugal. *Mari. Pollut. Bull.* 53, 91-99.

Chaix E., 2013. Mémoire de stage M1. 25p.

Chakravarti D., Venugopal D., Mailander P.C., Meza J.L., Higginbotham S., Cavalieri E.L., Rogan E.G., 2008. The role of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in inducing mutations in mouse skin. *Mutation Research* 649, 161-178.

Chandler G.T., 1990. Effects of sediment-bound residues of the pyrethroid insecticide fenvalerate on survival and reproduction of meiobenthic copepods. *Mar. Environ. Res.* 29, 65-76.

Chang E.S., Mykles D.L., 2011. Regulation of crustacean molting: A review and our perspectives. *Gen.Comp. Endocr.* 172, 323-330

CNRC (Centre national des Recherches Canada). 1983. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans un milieu aquatique: Formation, sources, devenir et effets sur le biote aquatique. Publication no.18981. CNRC, Groupe d'experts sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques, Sous-comité de l'eau. Ottawa.

Cohen-Kupiec R. & Chet I., 1998. The molecular biology of chitin digestion, *Current Opinion in Biotechnology* 9, 270-277.

Colwell R.R., 2000. Bacterial death revisited. In: Colwell, R.R., Grimes, D.J. (Eds.), *Non Culturable Microorganisms in the Environment*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 325-342.

Comber M.H.I., Williams T.D., Stewart K.M., 1993. The effects of nonylphenol on *Daphnia magna*. *Wat. Res.* 27, 273-276.

- Connon R.E., Geist J. & Werner I., 2012. Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors (Basel)*, 12, 12741-12771.
- Cooksey K.E., Wigglesworth-Cooksey B., 1995. Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: a review, *Aquatic Microbial Ecology*, 87-96.
- Coors A., Vanoverbeke J., De Bie T., De Meester L., 2009. Land use, genetic diversity and toxicant tolerance in natural populations of *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 95, 71-79.
- Costello J.H., Strickler J.R., Marrase C., Trager G., Zeller R., Freise A.J., 1990. Grazing in a turbulent environment: Behavioural response of a calanoid copepod, *Centropages hamatus*. *Proceedings of the National Academy of Science* 87,1648-1652.
- Crider J.Y., Wilhim J., Harmon H.J., 1982. Effects of naphthalene on the hemoglobin concentration and oxygen uptake of *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 28, 52-57.
- Cripe, G. M., Cripe, C. R., 1990. Comparative Acute Sensitivity of Selected Estuarine and Marine Crustaceans to Toxic Substances, EPA 600/X-90/358. U.S. Environmental Protection Agency, Gulf Breeze, FL.
- Dahms H-U., Harder T., Qian P-Y., 2007. Selective attraction and reproductive performance of a harpacticoid copepod in a response to biofilms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 341, 228-238.
- Daniels R.E., Allan J.D., 1981. Life table evaluation of chronic exposure to a pesticide. *Canadian Journal of Fish aquatic Science* 38, 485-494.
- David A., Fenet H., Gomez E., 2009. Alkylphenols in marine environments: distribution monitoring strategies and detection considerations. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 953-60
- Denissenko M.F., Pao A., Tang M., Pfeifer G.P., 1999. Preferential formation of benzo(a)pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274, 430-432.
- Depledge M.H., 1994. Genotypic toxicity: implication for individuals and populations. *Environ. Health Perspect. Res.* 102, 101-104.
- Devreker D., Souissi S., Forget-Leray J., Leboulenger F., 2007. Effects of salinity and temperature on the post embryonic development of *Eurytemora affinis* (Copepoda; Calanoida) of the Seine estuary: a laboratory study. *J. Plankton Res.* 29, 117-133.
- Devreker D., Souissi S., Seuront L., 2004. Development and mortality of the first naupliar stages of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) under different conditions of salinity and temperature. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 303, 31-46.
- Devreker D., Souissi S., Winkler G., Forget-Leray J., Leboulenger F., 2009. Effects of salinity and temperature on the reproduction of *Eurytemora affinis* (Copepoda; calanoida) from the Seine estuary: a laboratory study (the importance of individual variability). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 368, 113-123.

Devreker, 2007. Dynamique de population du copépode *Eurytemora affinis* dans estuaire de Seine : approche combinée *in situ* multi-échelle et expérimentale. Thèse de doctorat, université du Havre, le Havre,

Devreker, D., Souissi, S., Seuront, L., 2005. Effects of chlorophyll concentration and temperature variation on the reproduction and survival of *Temora longicornis* (Copepoda, Calanoida) in the Eastern English Channel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 318, 145-162.

Dewitt T.H., Ozretich R.J., Swartz R.C., Lamberson J.O., Schults D.W., Ditsworth G.R., Jones J.K.P., Hoselton L., Smith L.M., 1992. The influence of organic matter quality on the toxicity and partitioning of sediment associated fluorethene. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 197-208.

Dillon T.M., Burton W.D.S., 1991. Acute Toxicity of PCB Congeners to *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 208-215.

DiPinto L.M., Coull B.C., Chandler G.T., 1993. Lethal and sublethal effects of the sediment-associated PCB Aroclor 1254 on a meiobenthic copepod. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1909-1918.

DiPinto L.M., Coull B.C., Chandler G.T., 1993. Lethal and sublethal effects of the sediment associated PCB aroclor 1254 on a meiobenthic copepod. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1909-1918.

Donkin P., Widdows J., Evans S.V., Worrall C.M., Carr M., 1989. Quantitative structure-activity relationships for the effect of hydrophobic organic chemicals on rate of feeding by mussels (*Mytilus edulis*). *Aquat. Toxicol.* 14, 277-294.

Duchet C., Inafuku M.M., Caquet T., Larroque M., Franquet E., Lagneau C., 2011. Chitobiase activity as an indicator of altered survival, growth and reproduction in *Daphnia pulex* and *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) exposed to *Bacillus thuringiensis israelensis*, spinosad and diflubenzuron. *Ecotox. Environ. Safe.* 74, 800-810.

Dumontet S., Krovacek K., Baloda S.B., Grottol, R., Pasquale V., Vanucci S., 1996. Ecological Relationship between *Aeromonas* and *Vibrio spp.* and planktonic copepods in the coastal marine environment in Southern Italy. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 245-254.

Dur G., Souissi S., Devreker D., Ginot V., Schmitt F.G., Hwang J.S., 2009. An individual-based model to study the reproduction of egg bearing copepods: Application to *Eurytemora affinis* (Copepoda Calanoida) from the Seine estuary, France. *Ecological Modelling* 220, 1073-1089.

EFSA, 2005. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the presence of non dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCB) in feed and food (question n° EFSA-Q-2003-114). *The EFSA journal* 284, 1-137.

Eisler R. 1987. Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. Biological Report Publication No. 85(1.11). Contaminant Hazard Reviews Report No. 11. U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Patuxent Wildlife Research Center, Laurel, MD.

Eisler R., 1986. Polychlorinated biphenyl hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. Biological Report 85(1.7), Contaminant Hazard Reviews Report No. 7, Fish and Wildlife Service, U.S. Department of the Interior, 72 p.

Espie P.J., Roff J.C., 1995. Characterization of chitinase from *Daphnia magna*, and its relation to chitin flux. *Physiol. Zool.* 68, 727-748.

European Union., 1999. Risk assessment of 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol. Final Draft Report.

European Union., 2002. Assessment Report: 4-nonyl-phenol (branched) and nonylphenol, Series: 2nd Priority List Volume: 10.

European Union., 2005. Common implementation strategy for the water framework directive, 4-Nonylphenol (Branched) and Nonylphenol, Final version.

Fairbridge R.W., 1980. The estuary: its definition and chemical role. *In: Chemistry and biochemistry of estuaries*. E.O.I. Cato (eds), John Willey and Sons, Chichester, 1-35.

Fangstrom B., Athanasiadou M., Grandjean P., Weihe P., Bergman A., 2002. Hydroxylated PCB metabolites and PCBs in serum from pregnant Faroese women. *Environ. Health Perspect.* 110, 895-899.

Fernandes M.B., Sicre M.A., Boireau A., Tronczynsky J., 1997. Polyaromatic hydrocarbons (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 34, 857-867.

Fingerman, S.W., Fingerman, M., 1977. Effects of a polychlorinated biphenyl and a polychlorinated dibenzofuran on molting of the fiddler crab, *Uca pugnator*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 18, 138-142.

Fisher W.S., Foss S.S., 1993. A simple test for the toxicity of number 2 fuel oil and oil dispersants to embryos of grass Shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Mar. Pollut. Bull.* 26, 385-391.

Fisson C., Leboulenger F., Lecarpentier T., Moussard S., Ranvier G. 2014. L'estuaire de Seine : Etat de santé et évolution. *Fascicule Seine aval* 3.1., Gip Seine Aval, 45p.

Flach J., Pilet P.-E., Jolles P., 1992. What's new in chitinase research? *Experientia* 48, 701-716.

Fleeger J.W., Gust K., Marlborough S.J., 2007. Mixtures of metals and Poly nuclear Aromatic Hydrocarbons elicit complex, nonadditive toxicological interaction in meiobenthic copepods. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1677-1685.

Fockedey N. & Mees J., 1999. Feeding of the hyperbenthic mysid *Neomysis integer* in the maximum turbidity zone of the Elbe, Westerschelde and Gironde estuaries. *J. Mar. Sys.* 22, 207-228.

Forget J., Beliaeff B., Bocquené G., 2003. Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquatic Toxicology* 62, 195-204.

Forget J., Bocquené G., Leboulenger F., 2002. Impact des contaminants présents en estuaire de Seine sur les fonctions neuromusculaires et reproductrices du copépe *Eurytemora affinis*.

Etat d'avancement des travaux du programme coordonné de recherche sur l'estuaire de Seine (Thème I), 11p.

Forget J., Pavillon J.F., Menasria M.R. & Bocquené G., 1998. Mortality and LC₅₀ values for arsenic and cadmium and the pesticides atrazine, carbofuran, dichlorvos, and malathion. *Ecotox. Environ. Safe.* 40, 239-244.

Forget-Leray J., Landriau I., Minier C., Leboulenger F., 2005. Impact of endocrine toxicants on survival, development and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *Ecotox. Environ. Safe.* 60, 288-294.

Forget-Leray J., Petit F. Souissi S., Budzinski H., 2013. Etude des processus adaptatifs susceptibles de se mettre en place au sein de populations d'*Eurytemora affinis* exposées à diverses contaminations chimiques et/ou microbiologiques (COBAC)- *Rapport Seine aval 4*, 44p.

Fossi M.C., Leonzio C. (Eds), 1994. Non destructive biomarkers in vertebrates. Lewis Publisher, Boca Raton, FL, 345pp.

Franklin R.B., Elcombe C.R., Vodnick M.J., Lech J.J., 1980. Comparative aspects of the disposition and metabolism of xenobiotics in Fish and Mammals. *Federation Proceedings* 39, 3144-3149.

Galván N., Teske D.E., Zhou G., Moorthy B., MacWilliams P.S., Czuprynski C.J., Jefcoate C.R., 2005. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 in liver and lung by benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene do not affect distribution of polycyclic hydrocarbons to target tissue: role of AhR and CYP1B1 in bone marrow cytotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 202, 244-257.

Garcia-Armisen T., Touron A., Petit F., Sevais P., 2005. Sources of microbiological contamination in the Seine estuary (France). *Estuaries*. 28, 627-633.

Garric J., Morin S., Vincent-Hubert F., 2010. Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage. *Sciences Eaux et Territoires*. IRSTEA n°1.

Geiger D.J., Northcott C.E., Call D.J., Brooke L.T., 1985. Acute toxicities of organic pollutants to fathead minnow (*Pimephales promelas*). II. Center for Lake Superior Environmental Studies. Superior, WI, USA.

Geiger J.G., Buikema A.L. Jr, 1981. Oxygen consumption and filtering rate of *Daphnia pulex* after exposure to water-soluble fractions of naphthalene, phenanthrene, N° 2 fuel oil and coal-tar creosote. *Bull. Environ. Contami. Toxicol.* 27, 783-787.

Geiger J.G., Buikema A.L.J., 1992. Hydrocarbons depress growth and reproduction of *Daphnia pulex* (Cladocera). *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences* 39, 830-836.

Gismondi E., Thomé JP., 2014. Effects of two PBDE congeners on the moulting enzymes of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Environ. Pollut.* 191, 119-125.

Gladen B.C., Doucet J., Hansen L.G. 2003. Assessing human polychlorinated hydrocarbons biphenyl contamination for epidemiologic studies: Lessons from patterns of congener concentrations in Canadian in 1992. *Environ. Health Perspect.* 111, 437-443.

- Gonzales, C.R.M., Bradley, B.P., 1994. Salinity stress protein in *Eurytemora affinis*. *Hydrobiologia* 292/293, 461-468.
- Granmo A., Ekelund R., Magnusson K., Berggren M., 1989. Lethal and sublethal toxicity of 4-nonylphenol to the common mussel *Mytilus edulis* L. *Environ. Pollut.* 59, 115-127.
- Green A.S., Chandler G.T., Piegorsch W.W., 1996. Life stage specific toxicity of sediment-associated chlorpyrifos to a marine, infaunal copepod. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1182-1188.
- Guan R., Wang W-X., 2006. Comparison between two clones of *Daphnia magna*: Effects of multigenerational cadmium exposure on toxicity, individual fitness, and biokinetics. *Aquat. Toxicol.* 76, 217-229.
- Guézennec L., Romaña L-A., Goujon R., Meyer R., 1999. Seine Aval, un estuaire et ses problèmes, Fascicule 1, Ifremer Edition, 29p.
- Guo F., Wang L., Wang W-X., 2012. Acute and chronic toxicity of polychlorinated biphenyl 126 to *Tigriopus japonicus*: Effects on survival, growth, reproduction, and intrinsic rate of population growth. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 639-645.
- Hagopian-Schlekat T., Chandler G.T., Shaw T.J. 2001. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Mar. Environ. Res.* 51, 247-264.
- Hall, L. W., Ziegenfuss, M. C., Anderson, R. D., and Tierney, D. P., 1995. The influence of salinity on the chronic toxicity of atrazine to an estuarine copepod: Implications for development of estuarine chronic criterion. *Arch. Environ. Con. Toxicol.* 28, 344-348.
- Hamel F., Boivin R., Tremblay C., Bellemare G., 1997. Structural and evolutionary relationships among chitinases of lowering plants. *J. Mol. Evol.* 44, 614-624.
- Hannah J.B., Hose J.E., Landolt M.L., Miller B.S., Felton, S.P., Iwaoka W.T., 1982. Benzo(a)pyrene-induced morphologic and developmental abnormalities in rainbow trout. *Arch. Environ. Con. Toxicol.* 11, 727-734.
- Hansen B., Bech G., 1996. Bacteria associated with a marine planktonic copepod in culture. I. Bacterial genera in seawater, body surface, intestines and fecal pellets and succession during fecal pellet degradation. *J. Plankton Res.* 18, 257-273.
- Hansen B., Fotel F.L., Jensen N.J., Madsen S.D., 1996. Bacteria associated with a marine planktonic copepod in culture. II. Degradation of fecal pellets produced on a diatom, a nanoflagellate or a dinoflagellate diet. *J. Plankton Res.* 18, 275-288.
- Hanson M.L., Lagadic L., 2005. Chitinase activity as an indicator of aquatic ecosystem health. *Aquat. Ecosyst. Health.* 8, 441-450.
- Haritash A.K., Kaushik C.P., 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazard Materials* 169, 1-15.

Hashioka T., Yamanaka Y., 2007. Seasonal and regional variations of phytoplankton groups by top-down and bottom-up controls obtained by a 3-D ecosystem model. *Ecology Modelling* 202, 68-80.

Hawkins W.E., Walker W.W., Lytle T.F., Lytle J.S., 1991. Overstreet R M. Studies on the carcinogenic effects of benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene on the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). In: Mayes M.A., Barron M.G. (Eds), Aquatic Toxicology and Risk Assessment 14, ASTM STP1124, Philadelphia, 97-104.

Hecht S., Boese B.L., 2002. Sensitivity of the infaunal amphipod, *Eohaustorius estuaries* to acute waterborne exposures of 4-nonylphenol: Evidence of a toxic hangover. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 816-819.

Heinle D. R., Harris R. P., Ustach J. F., Flemer D. A., 1977. Detritus as food for estuarine copepods. *Mar. Biol.* 40, 341-353.

Hervio-Heath D., Colwell R.R., Derrien A., Robert-Pillot A., Fournier J.M., Pommepuy M., 2002. Occurrence of pathogenic vibrios in coastal areas of France. *Journal of Applied Microbiology* 92, 1123-1135.

Hirano M., Ishibashi H., Kim J-W., Matsumura N., Arizono K., 2009. Effects of environmentally relevant concentrations of nonylphenol on growth and 20-hydroxyecdysone levels in mysid crustacean, *Americanysis bahia*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149, 368-373.

Hoffman D.J., Gay M.L., 1981. Embryotoxic effects of benzo[a]pyrene, chrysene, and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in petroleum hydrocarbon mixtures in mallard ducks. *J. Toxicol. Environ. Health.* 7, 775-787.

Hoffmann M., Brown E.W., Feng P. CH., Keys C. E , Fischer M., Monday S.R., 2010. PCR-based method for targeting 16S-23S rRNA intergenic spacer regions among *Vibrio* species. *BMC Microbiology* 10 :90.

Holcombe G. W., Phipps G. L., Knuth M. L. & Felhaber T., 1984. The acute toxicity of selected substituted phenols, benzenes and benzoic acid esters to fathead minnows *Pimephales promelas*. *Environ. Pollut. (Series A)* 35, 367-81.

Huggett R.J., Kimerle R.A., Mehrle Jr P.M., Bergman H.L., 1992. Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Boca Raton, Fla. Lewis. 346 p.

Huls A.G., 1992. Acute and chronic toxicity of nonylphenol to *Daphnia magna*. Final Study Report Numbers DK-522, DL-143, Marl, Germany.

Humes A.G., 1994. How many copepods? *Hydrobiologia* 292/293, 1-7.

Huq A., West P.A., Small E.B., Huq M.I., Colwell R.R., 1983. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and plankton crustacean copepods. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 275-283.

- Hutchinson T., Williams T., Eales G.J., 1994. Toxicity of Cadmium, hexavalent Chromium and copper to marine fish larvae *Cyprinodon variegatus* and copepods *Tisbe battagliai*. *Mar. Environ. Res.* 38, 275-290.
- Hutchinson T.H., Pounds N.A., Hampel M., Williams T.D., 1999. Life-cycle studies with marine copepods (*Tisbe battagliai*) exposed to 20-hydroxyecdysone and diethylstilbestrol. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2914-2920.
- Jackson G.A., 1989. Simulation of bacterial attraction and adhesion to falling particles in an aquatic environment, *Limnol. Oceanogr.* 34, 514-530.
- Janda J.M., Abbott S.L., 2010. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 35-73.
- Jemec A., Drobne D., Tisler T., Sepčić K., 2010. Biochemical biomarkers in environmental studies lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 17, 571-81.
- Jiang Z., Huang Y., Chen Q., Zeng J., Xu X., 2012. Acute toxicity of crude oil water accommodated fraction on marine copepods: The relative importance of acclimatization temperature and body size. *Mar. Environ. Res.* 81, 12-17.
- Jifa W., Yu Z., Xiuxian S. & You, W., 2006. Response of integrated biomarkers of fish(*Lateolabrax japonicus*) exposed to benzo[a]pyrene and sodium dodecylbenzenesulfonate. *Ecotox. Environ. Safe.* 65, 230-236.
- Jing H., Shek L., Yung W., Jin X., Liu H., 2012. Dynamics of bacterial community composition during degradation of copepod fecal pellets. *J. Plankton res.* 34, 700-710.
- Johnson K.E., Perreau L., Charmantier G., Charmantier-Daures M., Lee C.E., 2014. Without gills: localization of osmoregulatory function in the copepod *Eurytemora affinis*. *Physiol. Biochem. Zool.* 87,310-24.
- Jores J., Stephan R., Knabne, D., Gelderblom H.R., Lewin A., 2003. Isolation of *Vibrio vulnificus* and atypical *Vibrio* from surface water of the Baltic Sea in Germany. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* (Berlin) 116, 396-400.
- Jorgensen E., 2010. *Ecotoxicology*. Academic Press, 402 p.
- Kagan J., Kagan E.D., Kagan I.A., Kagan P.A., Quigley S., 1985. The phototoxicity of non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. *Chemosphere* 14, 1829-1834.
- Kagan J., Sinnott D., Kagan E.D., 1987. The toxicity of pyrene in the fish *Pimephales promelas*: synergism by piperonyl butoxide and by ultraviolet light. *Chemosphere* 16, 2291-2298.
- Kaneko,T., Colwell, R.R., 1975. Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto Chitin and Copepods. *Applied and Environmental Microbiology* 29, 269-274.
- Katona S.K., 1971. The developmental stages of *Eurytemora affinis* (Poppe, 1880)(Copepoda, Calanoida) raised in laboratory cultures, including a comparison with the larvae of *Eurytemora*

americana Williams, 1906, and *Eurytemora herdmanni* Thompson & Scott, 1897. *Crustaceana* 21, 5-20.

Katona S.K., 1973. Evidence for sex pheromones in planktonic copepods. *Limnol. Oceanogr.* 18, 574-583.

Katona S.K., 1975. Copulation in the copepod *Eurytemora affinis* (Poppe, 1880). *Crustaceana* 28, 89-95.

Kawecki T.J., Ebert D., 2004. Conceptual issues and local adaptation. *Ecology Letters* 7, 1225-1241.

Kennish M.J., 1992. Ecology of estuaries anthropogenic effects. CRC Marine Science Series Press, Boca Raton, FL. 467p.

Kim S.G., Park D.K., Jang S.W., Lee J.S., Kim S.S., Chung M.H., 2008. Effects of dietary benzo[a]pyrene on growth and hematological parameters in Juvenile Rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81, 470-474.

Kim Y., Cooper K.R., 1999. Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in the embryos and newly hatched larvae of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 39, 527-538.

Kimmel D.G., Bradley B.P., 2001. Specific protein responses in the calanoid copepod *Eurytemora affinis* (Poppe, 1880) to salinity and temperature variation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 266, 135-149.

Kovatch C.E., Chandler G.T., Coull B.C., 1999. Utility of a full life-cycle copepod bioassay approach for assessment of sediment-associated contaminant mixtures. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 692-701.

Kukkonen J., Landrum P.F., 1994. Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated pyrene to *lumbricus variegatus* (*Oligochaeta*). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.

Kunisue T., Someya M., Kayama F., Jin Y., Tanabe S., 2004. Persistent organochlorines in human breast milk collected from primiparae in Dalian and Shenyang, China. *Environ. Pollut.* 131, 381-392.

Kusk K.O., Petersen S., 1997. Acute and chronic toxicity of tributyltin and linear alkylbenzenesulfonate to the marine copepod *Acartia tonsa*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1629-1633.

Lachambre M., Fisson C., 2007a. La contamination chimique : quel risque en estuaire de seine ? Fiche substance : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) - Seine Aval, 37 p.

Lachambre M., Fisson C., 2007b. La contamination chimique : quel risque en estuaire de seine ? Fiche substance : PolyChlorobiphényles (PCB) - Seine Aval, 26 p.

Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., 1997. Biomarqueurs en Ecotoxicologie : Principes et définitions. In Biomarqueurs en Ecotoxicologie : Aspects fondamentaux, Lagadic L, Caquet, Th, Amiard, JC & Ramade F (eds), Masson, Paris, 1-9.

Lagadic L., Caquet T., Ramade F., 1994. The role of biomarkers in environment assessment. Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology* 3, 193-208.

Lagadic, L., Caquet T., 1996. "Marqueurs biologiques de pollution, des outils au service de l'écotoxicologie." INRA mensuel 88, 34-38.

Landrum P.F., Dupuis W.S., Kukkonen J., 1994. Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated pyrene and phenanthrene in *Diporeia spp* : Examination of equilibrium-partitioning theory and residue-bases effects for assessing hazard. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1769-1780.

Landrum P.F., Lotufo G.R., Gossiaux D.C., Gedeon M.L., Lee J-H., 2003. Bioaccumulation and critical body residue of PAHs in amphipod, *Diporeia spp*: additional evidence to support toxicity additivity for PAH mixtures. *Chemosphere* 51, 481-489.

Lardy-Fontan, 2008. Les substances émergentes dans les écosystèmes aquatiques français : une application aux alkylphénol-polyéthoxylés et aux substances pharmaceutiques. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux I, Bordeaux, 479p.

Laroche E., Pawlak B., Berthe T., Skurnik D., Petit F., 2009. Occurrence of antibiotic resistance and prevalence of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 118-130.

Laughlin R.B. Jr., Neff J.M., 1979. Interactive effects of salinity, temperature and polycyclic aromatic hydrocarbons on the survival and development rate of larvae of the mud crab *Rhithropanopeus harrisi*. *Mar. Biol.* 53, 281-291.

Laughlin R.B. Jr, Young L.G.L., Neff J.M., 1978. A long-term study of the effects of water soluble fractions on No. 2 fuel oil and the survival, development rate, and growth of the mud crab *Rhithropanopeus harrisi*. *Mar. Biol.* 47, 87-95.

Lawrence D., Valiela I., Tomasky G., 2004. Estuarine calanoid copepod abundance in relation to season, salinity, and land-derived nitrogen loading, Waquoit Bay, MA. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 61, 547-557.

LeBlanc G.A., 1980. Acute toxicity of priority pollutants to water flea (*Daphnia magna*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 24, 684-691.

LeBlanc G.A., 1982. Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* (Straus) to environmental pollutants. *Environ. Pollut. (Series A)* 27, 309-322.

Leblanc G.A., Xuevan M. & Ride, C.V., 2000. Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product 4-Nonylphenol to the crustacean *Daphnia Magna*. *Environ. Health Perspect.* 108, 1133-1138.

Leblanc R. K., 2007. Crustacean endocrine toxicology: A review. *Ecotox. Environ. Safe.* 16, 61-81.

- Le Dean, L., and Devineau, J., 1987. In search of standardisation: A comparison of toxicity bioassays on two marine crustaceans (*Palaemon serratus* and *Tigriopus brevicornis*). *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 49, 187-198.
- Lee C.E., 1999. Rapid and repeated invasions of fresh water by the copepod *Eurytemora affinis*. *Evolution* 53, 1423-34.
- Lee W.Y., Zhang, X.K., von Baalen C.V., Arnold C.R., 1985. Feeding and reproductive performance of the harpacticoid *Tisbe carolinensis* (Copepoda, Crustacea) in four algal cultures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 24, 273-279.
- Lesueur T., Boulangé-Lecomte C., Xuereb B., Budzinski H., Cachot J., Vicquelin L., Giusti-Petruciani N., Marie S., Petit F., Forget-Leray J., 2013. Development of a larval bioassay using the calanoid copepod, *Eurytemora affinis* to assess the toxicity of sediment-bound pollutants. *Ecotox. Environ. Safe.* 94, 60-66.
- Lindley J.A., Donkin P., Evans S.V., George C.L., Uil, K.F., 1999. Effects of two organochlorine compounds on hatching and viability of calanoid copepod eggs. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 242, 59-74.
- Long E.R., Macdonald D.D., Smith S.L., Calder F.D., 1995. Incidence of adverse effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ. Management* 19, 81-97.
- Lonsdale D.J., Frey M.A., Snell T.W., 1998. The role of chemical signals in copepod reproduction. *J. Mar. Syst.* 15, 1-12.
- Lotufo G. R., 1996. Toxicity of Sediment-Associated PAHs to an Estuarine Copepod: Effects on Survival, Feeding, Reproduction and Behaviour. *Mar. Environ. Res.* 44, 149-166.
- Lotufo G. R., 1998. Lethal and sublethal toxicity of sediment-associated fluoranthene to benthic copepods: application of the critical-body-residue approach. *Aquat. Toxicol.* 44, 17-30.
- Lotufo G.R. & Fleeger J.W., 1997. Effect of sediment-associated phenanthrene on survival, development and reproduction of two species of meiobenthic copepods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151 91-102.
- Lotufo G.R., 1997. Toxicity of sediment-associated PAHs to an estuarine copepod: effects on survival, feeding, reproduction and behavior. *Mar. Environ. Res.* 44, 149-166.
- Lotufo G.R., 1998. Bioaccumulation of sediment-associated fluoranthene in benthic copepods: uptake, elimination and biotransformation. *Aquat. Toxicol.* 44, 1-15.
- Lussier S.M., Champlin D., LiVolsi J., Poucher S., Pruell R.J., 2000. Acute toxicity of par-nonylphenol to saltwater animals. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 617-621.
- Maki A.W., Johnson H.E., 1975. Effects of PCB (Aroclor 1254) and p' p' DDT on production and survival of *Daphnia magna* Strauss. *Bull. Environ. Con. Toxicol.* 13, 412-416.
- Matozzo V., Deppieri M., Moschino V., Marin, M.G., 2003. Evaluation of 4-nonylphenol toxicity in the clam *Tapes philippinarum*. *Environ. Res.* 91, 179-185.

Mauchline, J., 1998. The Biology of Calanoid Copepods. *Advances in Marine Biology*, 33, 1-710.

Maugeri T.L., Carbone M., Fera M.T., Irrera G.P., Gugliandolo C., 2004. Distribution of potentially pathogenic bacteria as free living and plankton associated in a marine coastal zone. *Journal of Applied Microbiology* 97, 354-361.

McCarthy J.F., Shugart L.R., 1990. Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers, Chelsea, Mich. 457p.

McCarthy S.A., Miller A.L., 1994. Effect of three biocides on Latin American and Gulf Coast strains of toxigenic *Vibrio cholerae* O1. *J. Food Prot.* 57, 865- 869.

McCauley D.J., DeGraeve G.M., Linton T.K., 2000. Sediment quality guidelines and assessment : overview and research needs. *Environmental Science & Policy* 3, 133-144.

McElroy A.E., Farrington J.W., Teal J.M., 1989. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Varanasi U. ed., CRC, Boca Raton, FL, USA pp 1-40.

McHenery J., Sward D., Seaton D.D., 1991. Lethal and sub-lethal effects of the salmon delousing agent Dichlorvos on the larvae of the lobster *Homarus gammarus* L. and herring *Clupea harengus* L." *Aquaculture* 98, 331-347.

McLeese D.W., Zitko V., Metcalfe C.D., 1980. Lethality of aminocarb and the components of the aminocarb formulation to juvenile Atlantic salmon, marine invertebrates and a freshwater clam. *Chemosphere* 9, 79-82.

McLeese D.W., Zitko V., Sergeant D. B., Burrige L., Metcalfe C. D., 1981. Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. *Chemosphere* 10, 723-30.

McManus G.B., Wyman K.D., Peterson W.T., 1983. Factors affecting the elimination of PCBs in the marine copepod *Acartia tonsa*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 15, 589-600.

Merzendorfer H., Zimoch L., 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206, 4393-412.

Millemann R. E., Birge W. J., Black J. A., Cushman R. M., Daniels K. L., Franco P. J., Giddings J. M., McCarthy J.F., Arthur J. S., 1984. Comparative acute toxicity to aquatic organisms of components of coal-derived synthetic fuels. Transactions of the American Fisheries Society 113,

Minier C., 2003. Etude des perturbations du système reproducteur des populations de poissons (Flet, Gobie) en estuaire et baie de Seine. *Rapport Seine-Aval 2002*, thème 1. 11p.

Minier C., Cachot J., Denier X., Hill E.M., Rotchell J., Puinean A.M., Peck M.R., Dussart G., Trigwell J. 2005. Détermination de l'origine et des conséquences pour la faune aquatique de certaines perturbations endocriniennes dans la région de Manche Orientale. *Programme européen Franco-Britannique Interreg IIIA*, Janvier 2005, 59p.

- Minier C., Hill E.M., Peck M., 2004. Contribution à l'évaluation du risque reprotoxique en estuaire de Seine. *Rapport Seine-Aval* 2003, thème 1, 19p.
- Mirelman D., 1986. Microbial lectins and agglutinins, Wiley-Interscience, New York.
- Miyata M., Furukawa M., Takahashi K., Gonzalez J.F., Yamazoe Y., 2001. Mechanism of 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracene-Induced Immunotoxicity: Role of Metabolic Activation at the Target Organ. *Pharmacology* 86, 302-309.
- Monsanto Industrial Chemicals Co., 1985. Chemical hazard information profile: nonylphenol. Report to the Office of Toxic Substances, US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Montanari M.P., Pruzzo C., Pane L., Colwell R.R., 1999. *Vibrios* associated with plankton in a coastal zone of the Adriatic Sea (Italy). *FEMS Microbiol. Ecol.* 29, 241-247.
- Moore M.N., Depledge M.H., Readman J.W., Paul Leonard D.R., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552, 247-268.
- Moraïtou-Apostolopoulo M., Verriopoulos G., 1982. Toxicity of chromium to the marine planktonic copepod *Acartia clausii*, Giesbrecht. *Hydrobiologia* 96, 121-127.
- Morgan A.J., Kill P., Stürzenbaum S.R., 2007. Microevolution and Ecotoxicology of Metals in Invertebrates. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1085-1096.
- Moriarty F., 1990. Ecotoxicology. The study of pollutants in Ecosystems. Academic Press, London, 289p.
- Mothershead T.R.I., Hale R.C., 1992. Influence of ecdysis on the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in field exposed blue crabs *Callinectes sapidus*. *Mar. Environmental Research* 33, 145-156.
- Mouneyrac C. Amiard-Triquet C., 2013. Biomarkers of Ecological Relevance in *Ecotoxicology. Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*, Editors: Féraud JF and Blaise C. ISBN: 978-94-007-5040-1, 221-236.
- Mouny P., Dauvin J.C., Bessineton C., Elkaim B., Simon S., 1998. Biological components from the Seine estuary: first results. *Hydrobiologia* 373/374, 333-347.
- Mouny P., Dauvin J.C., 2002. Environmental control of mesozooplankton community structure in the Seine estuary (English Channel). *Oceanologica Acta* 25, 13-22.
- Mouny, P., 1998. Structure spatio-temporelle du zooplankton et du suprabenthos de l'estuaire de Seine. Dynamique et rôle des principales espèces dans la chaîne trophique pélagique. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, 406p.
- Munro P.D., Barbour A., Birkbeck T.H., 1995. Comparison of the growth and survival of larval Turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a Marine *Aeromonas* sp. *Applied of Environmental microbiology* 61, 4425.

Munschy C., Moisan K., Tronczynski J., 1996. Inventaire et comportement géochimique de contaminants organiques majeurs dans l'estuaire de Seine. Rapport Seine-Aval 1995, thème 3, pp. 2-37.

Muysen B.T.A., Janssen C.R., 2001. Multi-generation zinc acclimation and tolerance in *Daphnia magna*: implications for water quality guidelines and ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2053-2060.

Muysen B.T.A., Janssen C.R., Bossuyt B.T.A., 2002. Tolerance and acclimation to zinc of field-collected *Daphnia magna* populations. *Aquat. Toxicol.* 56, 69-79.

Muzzarelli R.A.A., 1977. In: Muzzarelli, R.A.A. (Ed.), Chitinases and related enzymes: Chitin. Pergamon, pp. 155-177.

Mykles D.L., 2011. Ecdysteroid metabolism in crustaceans. *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* 27, 196-203.

Nagarajah N., Sophia A.J.A., Balasubramanian T., 1985. Behaviour of some intertidal molluscs exposed to water-soluble fractions of diesel. *Mar. Pollut. Bull.* 16, 267-271.

Nagasawa H., 2012. The crustacean cuticle: structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience* 4, 711-720.

Nakagawa Y., Henrich V.C., 2009. Arthropod nuclear receptors and their role in molting. *FEBS Journal* 276, 6128-6157.

Nakari T., Huhtala S., 2008. Comparison of toxicity of congener-153 of PCB, PBB, and PBDE to *Daphnia magna*. *Ecotox. Environ. Safe.* 71, 514-518.

Nakatsuji T., Lee CY, Watson RD., 2009. Crustacean molt-inhibiting hormone: structure, function, and cellular mode of action. *Comp. Biochem. Physiol. A* 152, 139-148.

Nalin D.R., Daya, V., Levine, M.M., Cisneros, L., 1979. Adsorption and growth of *Vibrio cholerae* on chitin. *Infect. Immun.* 25, 768-770.

Narbonne J.F, Guarrigues P, Budzinski H, Morin B, Augagneur S, Clerandau C, Mora P., 2004. Etude de la contamination chimique de l'estuaire de la Seine par l'utilisation de biomarqueurs, de bioessais et couplage avec analyses chimiques. Programme Seine Aval 2. Rapport annuel 2003. 49 p

NAS/NRC (National Academy of Science, National Research Council)., 1989. Report of the oversight committee. In: Biologic markers in reproductive toxicology. Washington, DC: National Academy of Sciences, National Research Council, National Academy Press.

NAS/NRC (National Academy of Science, National Research Council)., 2007. Toxicity testing in the 21st century: A Vision and strategy. Committee on Toxicity Testing and Assessment of Environmental Agents. Washington, DC: National Academy of Science, National Research Council, National Academy Press.

Naylor C.G., 1995. Environmental fate and safety of nonylphenol ethoxylates. *American Association of Textile Chemists and Colorists* 27, 29-33.

Neff J.M., 1979. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. Sources, Fates and biological Effects. Applied Science Publishers, Essex, UK, 262 pp.

Neff J.M., 1985. Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Fundamentals of Aquatic Toxicology. Ed. G.M. Rand and S. R. Petrocelli. *Hemisphere*, New York, p. 416-454

Nice H.E., Moritt T., Crane M., Thorndyke M., 2003. Long-term and transgenerational effects of nonylphenol exposure at a key stage in the development of *Crassostrea gigas*: Possible endocrine disruption? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 256, 293-300.

NRC (Committee on Biological Markers of the National Research Council), 1987. Biological markers in environmental health research. *Environ. Health Perspect.* 74, 3-9.

O'Brien P., Feldman H., Grill E.V., Lewis A.G., 1988. Copepod tolerance of the life history stages of the splashpool copepod *Tigriopus californicus* (Copepoda, harpacticoida). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 44, 59-64.

O'halloran, S.L., Liber, K., Gangl, J.A., Knuth, M.L., 1999. Effects of repeated exposure to 4-nonylphenol on the zooplankton community in littoral enclosures. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 376-385.

Oberdöster E., Cheek A-O., 2001. The beach: Endocrine disruption in marine and estuarine organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 23-36.

Oberdöster E., Brouwer M., Hoexum-Brouwer T., Manning S., McLachlan J.A., 2000. Long-term pyrene exposure of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, affects molting and reproduction of exposed males and offspring of exposed females. *Environ. Health Perspect.* 180, 641-646.

Oberdöster E., Cottam D.M., Wilmot F.A., Milner M.J., McLachlan J.A., 1999. Interaction of PAHs and PCBs with ecdysone-dependant gene expression and cell proliferation. *Toxicol. Appl. Pharm.* 160, 101-108.

Ott F.S., Harris R.P., O'Hara S.C.M., 1978. Acute and sublethal toxicity of naphthalene and three methylated derivatives to estuarine copepod *Eurytemora affinis*. *Mar. Environ. Res.* 1, 49-58.

Palanikumar L., Kumaraguru A.K., Ramakritinan C.M., Anand M., 2012. Biochemical response of anthracene and benzo[a]pyrene in milkfish *Chanoschanos*. *Ecotox. Environ. Safe.* 75, 187-197.

Pan J., Yang Y., Geng C., Yeung L.W.Y. Ciao X., Dai T., 2010. Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in marine and lacustrine sediments from the Shandong Peninsula, China. *J. Haz. Mat.* 176, 274-279.

Patil R.S., Ghormade V. , Deshpande M.V., 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enz. Microbiol. Tech.* 26, 473-483.

Peakall D., 1992. Animal biomarkers as pollution indicators. Chapman et Hall, London. 37p.

Peakall D.B., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology* 3, 157-160.

Perez-Landa V., Simpson S.L., 2011. A short life-cycle test with the epibenthic copepod *Nitocra spinipes* for sediment toxicity assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1430-1439.

Portmann J.E., Wilson K.W., 1971. The toxicity of 140 substances to the brown shrimp and other marine animals. Shellfish Information Leaflet No. 22 (2nd Ed.), Ministry of Agric. Fish. Food, Fish. Lab. Burnham-on-Crouch, Essex, and Fish Exp. Station Conway, North Wale, 12 pp.

Poulet S.A., Samain J.F., Moal J., 1986. Chemoreception, nutrition and food requirements among copepods. *Sylogus* 58, 426-442.

Prato E., Parlapiano I., Biandolino F., 2012. Evaluation of a bioassays battery for ecotoxicological screening of marine sediments from Ionian Sea (Mediterranean Sea, Southern Italy). *Environ. Monit. Assess.* 184, 5225-5238.

Raisuddin F.L., Kwok K.W., Leung K.M., Schlenk D. & Lee J.S., 2007. The copepod : a promising marine model for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquat. Toxicol.* 83, 161-173.

RAMADE, F., 1998. Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau. Paris, Ediscience international: 785p

Renkema G.H., Boot R.G., Muijsers A.O., Donker-Koopman W.E., Aerts J.M.F.G., 1995. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 2198-2202.

Reynaud S., Deschaux P., 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquat. Toxicol.* 77, 229-238.

Rhodes S., Farwell A., Hewitt L.M., MacKinnon M., Dixon D.G., 2005. The effects of dimethylated and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of the Japanese Medaka. *Ecotoxi. Environ. Safe.* 60, 247-258.

Richards, S.M., Kelly, S.E., Hanson, M.L., 2008. Zooplankton chitobiase activity as an endpoint of pharmaceutical effect. *Arch. Environ. Con. Toxicol.* 54, 637-644.

RNO, 2006. Surveillance du Milieu Marin. Travaux du RNO. Edition 2006. Ifremer et Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable. ISSN 1620-1124

Roddie B.D., Leakey R.J.G., Berry A.J., 1984. Salinity-temperature tolerance and osmoregulation in *Eurytemora affinis* (Poppe) (Copepoda: Calanoida) in relation to its distribution in the zooplankton of the upper reaches of the forth estuary. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 79, 191-211.

Roesijadi G., Perocelli S.R., Anderson J.W., Giam C.S., Neff G.E., 1976. Toxicity of Polychlorinated Biphenyl (Aroclor 1254) to adult, juvenils and larvae stages of the shrimp: *Palaemonetes pugio*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 15, 297-304 et 359-363.

Safe S.H., 1994. Polychlorinated biphenyls (PCBs); environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 24, 87-149.

Samuels R.I., Reynolds S.E., 1993. Molting fluid enzymes of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: timing of proteolytic and chitinolytic activity in relation to pre-ecdysial development. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 24, 33-44.

Sander R., 1999. Compilation of Henry's law constants for inorganic and organic species of potential importance in environmental chemistry. Version 3 [en ligne] <http://www.mpch-mainz.mpg.de/~sander/res/henry.html>.

Sastri, A.R., Roff, J.C., 2000. Rate of chitinase degradation as a measure of development rate in planktonic Crustacea. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 1965-1968.

Servos M.R., 1999. Review of the aquatic toxicity, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenol and alkylphenol polyethoxylate. *Wat. Qual. Res. J. Can.* 34, 123-177.

Sharma V.K., Anquandah G.A.K., Yngard R.A., Kim H., Fekete J., Bouzek K., Ray A.K. & Golovk D., 2009. Nonylphenol, octylphenol and bisphenol-A in the aquatic environment: A review on occurrence, fate, and treatment. *J. Environ. Sci. Health Part A Toxic/Hazardous substances and Environmental Engineering* 44, 423-442.

Sharpe R.M., Skakkebaek N.E., 2003. Male reproductive disorders and the role of endocrine disruption: Advances in understanding and identification of areas for the future research. *Pure Appl. Chem.* 75, 2023-2038.

Shaw G.R., Connell D.W., 1994. Prediction and monitoring of the carcinogenicity of polycyclic aromatic compounds (PACs). *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 135, 1-62.

Shurin B.J., Dosdson I.S., 1997. Sublethal toxic effects of cyanobacteria and nonylphenol on environmental sex determination and development in *Daphnia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1269-1276.

Simpson S.L. & Spadaro D.A., 2011. Performance and sensitivity of a rapid sublethal sediment toxicity test with the amphipod *Melita plumulosa* and the copepod *Nitocra spinipes*. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2326-2334.

Sinistro R., Sánchez M.L., Marinone M.C., Irina Izaguirre I., 2007. Experimental study of the zooplankton impact on the trophic structure of phytoplankton and the microbial assemblages in a temperate wetland (Argentina). *Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters* 37, 88-99.

Skaare J.U., 2002. Ecological risk assessment of persistent organic chemicals in the Arctic. *Toxicology* 181, 193-197.

Slooff W., Janus J.A., Matthijsen A.J.C.M., Montizaan G.K. & Ros J.P.M. 1989. Integrated criteria document. PAHs. Report No.758474011. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Les Pays Bas.

Smaghe G., 2009. Ecdysone: Structures and Functions. Springer. ISBN 978-1-4020-9112-4.

Smith S.B., Savino J.F., Blouin M.A, 1988. Acute toxicity to *Daphnia Pulex* of six classes of chemical compounds potentially hazardous to Great Lakes. *Aquatic Biota Journal of Great Lakes Research* 14, 394-404.

Snyder J M, Mulder P E., 2001. Environmental endocrine disruption in decapod crustacean larvae: hormone titers, cytochrome P450, and stress protein responses to heptachlor exposure. *Aquat. Toxicol.* 55, 177-190.

Spindler-Barth M., Van Wormhoudt A., Spindler K.D., 1990. Chitinolytic enzymes in the integument and midgut-gland of the shrimp *Palaemon serratus* during the moulting cycle. *Mar. Biol.* 106, 49-52.

Stalling D.L. & Mayer F.L. Jr, 1972. Toxicities of PCBs to fish and environmental residues. *Environ. Health Perspect.* 1, 159-164.

Staples C.A., Weeks J., Hall J.F., Naylor C.G., 1998. Evaluation of aquatic toxicity and bioaccumulation of C8- and C9-alkylphenol ethoxylates. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 2470-2480.

Steevens J.A., Slattery M., Schlenk D., Aryl A., Benson W.H., 1999. Effects of ultraviolet-B light and polyaromatic hydrocarbon exposure on sea urchin development and bacterial bioluminescence. *Mar. Environ. Res.* 48, 439-457.

Stegeman J.J., Brouwer M., Richard T.D.G., Förlin L., Fowler B.A., Sanders B.M., van Veld, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress.* : Lewis, Chelsea, MI, pp. 235-335.

Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L. (Eds.), Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp 235-335.

Stevenson J.R. 1985. Dynamics of the Integument. *In The Biology of Crustacea.* vol. 9 Academic Press., New York and London, 250-255. .

Strawbridge S., Coull B.C., Chnadler G.T., 1992. Reproductive output of a meiobenthic copepod exposed to sediment-associated fenvalerate. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23, 295-300.

Strickler J.R., 1992. Calanoid Copepods, Feeding Currents, and the Role of Gravity. *Science* 218, 158-160.

Strickler, J.R., 1998. Observing free-swimming copepods mating. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 353, 671-680.

Stringer T. J., Glover C.N., Keesing V., Northcott G.L., Tremblay L.A. 2012. Development of a harpacticoid copepod bioassay: Selection of species and relative sensitivity to zinc, atrazine and phenanthrene. *Ecotox. Environ. Safe.* 80, 363-371.

Stringer T.J., Glover C.N., Keesing V., Northcott G.L., Gaw S., Tremblay L.A., 2014. Development of acute and chronic sediment bioassays with the harpacticoid copepod *Quinquelaophonte* sp. *Ecotox. Environ. Safe.* 99, 82-91.

Stuhlbacher A., Bradley M.C., Naylor C., Calow P., 1992. Induction of cadmium tolerance in two clones of *Daphnia magna* Straus. *Comp. Biochem. Physiol. C* 101, 571-577.

Subasinghe S., 1995. The development of crustacean and mollusc industries for chitin and chitosan resources. In: Zakaria MB, Wan Muda WM, Abdullah MP, editors. Chitin and Chitosan. Malaysia: Penerbit Universiti Kebangsaan, 27-34.

Suedel B.C., Rodgers J.H. & Clifford P.A., 1993. Bioavailability of fluoranthene in freshwater sediment toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 155-165.

Sun P.Y., Foley H.B., Handschumacher L., Suzuki A., Karamanukyan T., Edmands S., 2014. Acclimation and adaptation to common marine pollutants in the copepod *Tigriopus californicus*. *Chemosphere* 112, 465-471.

Swartz R.C., Schultz D.W., Ozretich R.J., Lamberson J.O., Cole F.A., DeWitt T.H., Redmond M.S., Ferraro S.P., 1995. Σ PAH: A model to predict the toxicity of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures in field-collected sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1977-1987.

Swedmark M., 1968. Resistens hos risk mot glykol, tensider och en vanligtensid~vara. *Vatten*, 5, 430-43. (In Swedish).

Swedmark M., Braaten B., Emanuelsson E., Granmo A., 1971. Biological effects of surface active agents on marine animals. *Mar. Biol.* 9, 183-201.

Tahir A., Fletcher T.C., Houlihan D.F., Secombes C.J., 1993. Effect of short-term exposure to oil-contaminated sediments on the immune response of dab, *Limanda limanda* (L.). *Aquat. Toxicol.* 27, 71-82.

Teil M.J., Tlili K., Blanchard M., Labadie P., Alliot F., Chevreuil M., 2014. Polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers, and phthalates in roach from the Seine River basin (France): impact of densely urbanized areas. *Arch. Environ. Con. Toxicol.* 66, 41-57.

TemaNord, 1996. Chemicals with Estrogen-like Effects. Nordic council of Ministers, Copenhagen. ISBN 92 9120 918 X.

Thain J.E., Matthiessen P., Bifield S., 1990. "The toxicity of Dichlorvos to some marine organisms." ICES Marine Environmental Quality Committee CM 1990/E 18, ICES, Copenhagen, Denmark. 15pp.

Thomas P., 1990. Reproductive endocrine function in female Atlantic croaker exposed to pollutants. *Mar. Environ. Res.* 24, 179-183.

Thompson F.L., Tetsuya L., Swings J., 2004. Biodiversity of Vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 403-431.

Thompson, S., Budzinski, H., LeMenach, K., Letellier, M., Garrigues, P., 2002. Multiresidue

analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorobiphenyls, and organochlorine pesticides in marine sediments. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 196-204.

Thursby G.B., Berry W.J., Champlin D., 1989. Acute toxicity of acenaphthene to saltwater animals. Memorandum to David J. Hansen, February 7, 1989, 9 pp

Tiselius P., 1992. Behavior of *Acartia tonsa* in patchy food environments. *Limnol. Oceanogr.* 37, 1640-1651.

Titelman J., Varpe O., Eliassen S., Fiksen O., 2007. Copepod mating: chance or choice? *J. Plankton Res.* 29, 1023-1030.

Tobiszewski M., Namiesnik J., 2012. PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. *Environ. Pollut.* 162, 110-119.

Toppari J., 2003. Physiology and disorders of testicular descent. *Endocrine Development* 5, 104-109.

Toppari J., Larsen J.C., Christiansen P., Giwercman A., Grandjean P., Guillette L., Jégou J., Jensen T.K., Jouannet P., Keiding N., Leffers H., McLachlan J.A., Meyer O., Müller J., Rajpert-De Meyts E., Scheike T., Sharpe R., Sumpter J., Skakkebaek N.E., 1996. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 104, 741-803.

Torres G.C., Escrabino R., 2003. Growth and Development of *Calanus chilensis* nauplii reared under laboratory conditions : testing the effects of temperature and food resources. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 294, 81-99.

Touron A., Berthe T., Gargala G., Fournier M., Ratajczak M., Servais P., Petit F., 2007. Assessment of faecal contamination and the relationship between pathogens and faecal bacterial indicators in an estuarine environment (Seine, France). *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1441-1450.

Trucco R.G., Engelhardt F.R., Stacey B., 1983. Toxicity, accumulation and clearance of aromatic hydrocarbons in *Daphnia pulex*. *Environ. Pollut. Ser. A, Ecological and Biological* 31, 191-202.

Truhaut R., 1977. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotox. Environ. Safe.* 1, 51-73.

Turner J.W., Good B., Cole D., Lipp E.K., 2009. Plankton composition and environmental factors contribute to *Vibrio* seasonality. *The ISME Journal* 3, 1082-1092.

Unger M.A., Newman M.C., Vadas G.G., 2007. Predicting survival of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) during ethylnaphthalene, dimethylnaphthalene and phenanthrene exposures differing in concentration and duration. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 528-534.

Ustach J.F., 1982. Algae, bacteria and detritus as food for the harpacticoid copepod, *Heteropsyllus pseudonunni* Coull and Palmer. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 64, 203-214.

Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A.T.C., Brunstrom B., Cook P., Feeley M., Giesy J.P., Hanberg A., Hasegawa R., Kennedy S.W., Kubiak T., Larsen J.C., van Leeuwen F.X.R., Dijen Liem A.K., Nolt C., Peterson R.E., Poellinger L., Safe S., Schrenk D., Tillitt D., Tysklind M.,

Younes M., Waern F., Zacharewski T., 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* 106, 775-792.

Van Wezel A.P., Traas T., Polder M., Posthumus R., van Vlaardingen P., Crommentuijn T., van de Plassche E.J., 1999. Maximum Permissible Concentrations for polychlorinated biphenyls. RIVM report n° 601501 006, 129 p.

Vasseur P., Cossu-Leguille C., 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environ. Int.* 28, 711-717.

Vaupel-Klein J.C von., Weber R.E., 1975. Distribution of *Eurytemora affinis* (Copepoda: Calanoida) in relation to salinity: field and laboratory observations. *Netherlands Journal of Sea Research* 9, 297-310.

Vezzulli L., Pezzati E., Repetto B., Stauder M., Giusto G., Pruzzo C., 2008. A general role for surface membrane proteins in attachment to chitin particles and copepods of environmental and clinical vibrios. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 119-125.

Vicquelin L., 2011. Caractérisation fine de la toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) vis à vis des embryons et larves de poissons. Contribution à l'évaluation des risques environnementaux associés à la pollution dans l'estuaire de Seine. Thèse de doctorat, Université du Havre, Le Havre, 223 p.

Vicquelin L., Forget-Leray J., Peluhet L., LeMenach K., Deflandre B., Anschutz P., Etcheber H., Morin B., Budzinski H., Cachot J., 2011. A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese Medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquat. Toxicol.* 105, 235-245.

Wan X., Pan X., Wang B., Zhao S., Hu P., Li F., Boulanger B., 2011. Distributions, historical trends, and sources investigation of polychlorinated biphenyls in Dianchi Lake, China. *Chemosphere* 85, 361-367.

Ward, G. S., Ballantine, L., 1985. Acute and chronic toxicity of atrazine to estuarine fauna. *Estuaries* 8, 22-37.

Wassenberg D. M., Swails E.E., Di Giulio R.T., 2002. Effects of combined exposures to benzo[a]pyrene and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl on *Fundulus heteroclitus*. *Mar. Environ. Res.* 54, 279-283.

White P.A., Robitaille S., Rasmussen J.B., 1999. Heritable reproductive effects of benzo(a)pyrene on the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1843-1847.

WHO: International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environ. Health Crit.* 155, World Health Organization, Geneva.

Wilson J.G., 1994. The role of bioindicators in estuarine management. *Estuaries* 17, 94-101.

- Winckler D.L., Duncan K.L., Hose J.E. & Puffer H.W., 1983. Effects of benzo(a)pyrene on the early development of California grunion, *Leuresthes tenuis* (pisces, atherinidae). *Fisheries Bulletin* 81, 473-481.
- Winkler, G., Greve, W., 2004. Trophodynamics of two interacting species of estuarine mysids, *Praunus flexuosus* and *Neomysis integer*, and their predation on the calanoid copepod *Eurytemora affinis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 308, 127-146.
- Wirth E.F., Fulton M.H., Chandler G.T., Key P.B., Scott G.I., 1998 Toxicity of Sediment Associated PAHs to the Estuarine Crustaceans, *Palaemonetes pugio* and *Amphiascus tenuiremis*. *Environ. Contam. Toxicol.* 61, 637-644.
- Wollenberg L., Breitholz, M., Ole Kusk, K., & Bengtsson, B.-E., 2003. Inhibition of larval development of the marine copepod *Acartia tonsa* by four synthetic musk substances. *The Science of the Total Environment* 305, 53-64.
- Wood W.A., Kellog S.T., 1988. Biomass, Part B, Lignin, Pectin and Chitin. Methods in Enzymology, Academic Press.
- Wootton E.C.1, Dyrinda E.A., Pipe R.K., Ratcliffe N.A., 2003. Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquat. Toxicol.* 65, 13-25.
- Yen J., Strickler J.R., 1996. Advertisement and concealment in the plankton: What makes a copepod hydrodynamically conspicuous? *Invertebrate Biology* 115: 191-205
- Yoshimura., 1986. Biodregadation and fish toxicity of non ionic surfactants. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 63, 1590-1596.
- Youngson N.A., Whitelaw E., 2008. Transgenerational epigenetic effects. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9, 233-257.
- Zakikas J.P., 1984. Chitin, chitosan and related enzymes, Academic Press, New York.
- Zechmeister L., Töth G., 1939. Chromatographie der in der chitinreihe wirksamen Enzyme des emulsins, *Enzymologia* 7, 165-169.
- Zechmeister L., Töth G., Vajda E., 1939. Chromatographie der in der chitinreihe wirksamen Enzyme der weinbergschnecke (*helix pomatia*). *Enzymologia* 7, 170-175.
- Zhang P., Song J., Fang J., Liu Z., Li Z., Yuan, H., 2009. Once century record of contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in core sediments from the southern Yellow Sea. *J. Environ. Sci.* 21, 1080-1088
- Zou E., Fingerman M., 1997. Effects of Estrogenic Xenobiotics on Molting of the Water Flea, *Daphnia magna*. *Ecotox. Environ. Safe.* 38, 281-285.
- Zou E., Fingerman M., 1999a. Effects of Estrogenic Agents on Chitobiase Activity in the Epidermis and Hepatopancreas of the Fiddler Crab, *Uca pugilator*. *Ecotox. Environ. Safe.* 42, 185-190.

Zou E., Fingerman M., 1999b. Effects of exposure to diethyl phthalate, 4-(*tert*)-octylphenol, and 2,4,5-trichlorobiphenyl on activity of chitinase in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Phys. C* 122, 115-120.

Zou, E., Fingerman, M., 1999c. Patterns of N-acetyl- β -glucosaminidase isoenzymes in the epidermis and hepatopancreas and induction of N-acetyl- β -glucosaminidase activity by 20-hydroxyecdysone in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 124, 345-349.

Zou E., 2005. Impact of xenobiotics on crustacean molting: the invisible endocrine disruption. *Integr. Comp. Biol.* 45, 33-38.

Zou E. & Bonvillain R., 2004. Chitinase activity in the epidermis of the fiddler crab, *Uca pugilator*, as an in vivo screen for molt-interfering xenobiotics. *Comp. Biochem. Physiol. C* 139, 225-230.

<http://www.obs-vlfr.fr>

<http://www.LPO.fr>

<http://copepodes.obsbanyuls.fr/en/index.php>

ANNEXES

Annexes 1 : Les protocoles

Annexes 1.1

Protocole de dosage de l'activité chitobiase

Produits :

Les produits proviennent du fournisseur SIGMA ALDRICHT

Nom produit	Dangers	Pictogramme
Phosphate de sodium dibasic	irritant pour les yeux, la peau, les voies respiratoires	
(MUF-NAG 4 methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide)		NA
MUF (4-methylumbelliferyl acétate)	nocif en cas d'ingestion et risque de lésions oculaires graves	
2-methoxyethanol	irritant pour les yeux, la peau et les voies respiratoires	
Acide citrique, anhydre	toxique en cas d'ingestion, nocif par contact avec la peau, irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau	
NaOH anhydre		NA

Préparation des solutions :

Pour la préparation des solutions, veuillez porter ces EPI :



NaOH (0,25N) pH 14,1

- ✓ 5 g de NaOH dans 500 ml d'eau distillée
- ✓ Ajuster le pH à 14,1

Acide citrique(0,1M)

- ✓ 4,8 g d'acide citrique dans 250 ml d'eau distillée

Phosphate de sodium dibasique (0,2M)

- ✓ 7,05 g de phosphate de sodium dans 250 ml d'eau distillée

Tampon de phosphate citrique (0,15M) pH 5,5

- ✓ 65 ml d'acide citrique
- ✓ 85 ml de phosphate de sodium dibasique
- ✓ 150 ml d'eau distillée
- ✓ Ajuster le pH à 5,5

Préparation de la gamme de MUF

Solution mère à 5 mM

- ✓ Mettre 1,091 g dans 1 ml de methoxyethanol

<i>MUF (μM)</i>	<i>Volume MUF (μL)</i>	<i>Volume tampon (μL)</i>
5	1	999
2,5	500	500
1,25	500	500
0,625	500	500
0,3125	500	500
0,15625	500	500
0,078125	500	500
0,0390625	500	500
0	0	1

Le R^2 doit être de 0,99

Préparation du MUF-NAG (0,31 mM)

Principe du dosage :

Le dosage de l'activité chitobiase est utilisé en tant que marqueur de perturbation du cycle de mue chez les arthropodes (Zou and Fingerman, 1999 a,b). Le principe du dosage réalisé est extrait de la méthode d'Espie et Roff (1995). Le milieu d'exposition est filtré (0,22 μm) et conservé dans des tubes falcons jusqu'au moment du dosage. En parallèle, une gamme de MUF est réalisée (voir tableau) à partir d'une solution mère de MUF à 5 mM. Une solution de MUFNAG (0,31 mM) est réalisée. Dans une microplaque 96 puits, déposez 150 μL du milieu d'exposition au préalable filtré. Puis ajoutez 50 μL de la solution de MUFNAG. Faire une première lecture de la densité optique (DO) à 25 °C à 360 nm d'excitation et 450 nm d'émission dans l'obscurité. Au bout d'une heure ajouter 50 μL de NaOH (0,25 N) afin de stopper la réaction puis effectuer une nouvelle mesure.

Annexe1.2

Milieu de CONWAY

Matériel :

Chlorure de zinc ($Zn Cl_2$)

Cobalt hexahydraté ($Co Cl_2, 6H_2O$)

Cuivre pentahydraté ($Cu SO_4, 5H_2O$)

Ammonium heptamolybdate tetrahydraté ($6(NH_4) Mo_7 O_{24}, 4H_2O$)

Nitrate de sodium ($Na NO_3$)

Di-hydrogénophosphate de sodium ($Na H_2PO_4$)

Acide Ethylènediamine tetraacétique de sodium ($Na_2 EDTA$)

Acide borique ($H_3 BO_3$)

Chlorure de manganèse ($Mn Cl_2$)

Chlorure Ferrique ($Fe Cl_3$)

Thiamine (Vitamine B1)

Cyanocobalamine (Vitamine B12)

Métasilicate de sodium ($Na_2 SiO_3, 5H_2O$)

Protocole :

Solution Métallique

- Préparer un volume de 50 ml d'eau miliQ dans une fiole jaugée
- Transférer environ 5 ml d'eau miliQ dans un Becher 100 ml et dissoudre :
 - 1.05 g de chlorure de zinc ($Zn Cl_2$)
 - 1 g de chlorure de cobalt hexahydraté ($Co Cl_2, 6H_2O$)
 - 1 g de sulfate de cuivre pentahydraté ($Cu SO_4, 5H_2O$)
 - 0.45 g d'ammonium heptamolybdate tetrahydraté ($6(NH_4) Mo_7 O_{24}, 4H_2O$)
- Compléter le volume d'eau miliQ à 50 ml et mettre sous agitation
- Transférer la solution dans un Falcon 50 ml, envelopper d'un morceau de feuille d'aluminium et stocker à 4°C

Solution Principale

- Préparer un volume de 1 l d'eau miliQ dans une fiole jaugée

- Transférer environ 200 ml d'eau miliQ dans une bouteille de 1 l, mettre sous agitation et dissoudre :
 - 100 g de nitrate de sodium (Na NO_3)
 - 20 g de di-hydrogénophosphate de sodium ($\text{Na H}_2\text{PO}_4$)
 - 45 g d'acide éthylènediamine tétraacétique de sodium (Na_2EDTA)
 - 33.6 g d'acide borique (H_3BO_3)
 - 0.36 g de chlorure de manganèse (Mn Cl_2)
 - 1.3 g de chlorure Ferrique (Fe Cl_3)
- Compléter le volume d'eau miliQ à 1 l
- Ajouter 1 ml de Solution Métallique préalablement préparée et stocker à température ambiante

Solution Vitaminique

- Préparer un volume de 50 ml d'eau miliQ dans une fiole jaugée
- Transférer environ 5 ml d'eau miliQ dans un Becher 100 ml et dissoudre :
 - 100 mg de thiamine (Vitamine B1)
 - 5 mg de cyanocobalamine (Vitamine B12)
- Compléter le volume d'eau miliQ à 50 ml et mettre sous agitation
- Transférer la solution dans un Falcon 50 ml, envelopper d'un morceau de feuille d'aluminium et stocker à 4°C

Solution Silicatée (pour culture de diatomée, uniquement)

- Préparer un volume de 1 l d'eau miliQ dans une fiole jaugée
 - Transférer environ 200 ml d'eau miliQ dans une bouteille de 1 l, mettre sous agitation et dissoudre 40 g de métasilicate de sodium ($\text{Na}_2\text{SiO}_3, 5\text{H}_2\text{O}$)
- Compléter le volume d'eau miliQ à 1 l et stocker à température ambiante

Annexe 1.3

Protocole pour la culture des algues

La culture des algues a demandé un aménagement spécial permettant le bon développement des souches algales.

La pièce algue

La culture d'algue est réalisée à température ambiante (soit environ 20°C) sous éclairage constant (24/24). L'éclairage est assuré par des Néons GROLUX 36 W et des Néons bleu actinique 36 W. Il peut être souligné, néanmoins, que les souches algales ne sont pas directement exposées à l'éclairage des néons.

Le bullage des gros volumes (ballons ou bombonnes) est assuré par un compresseur AIR PUMP 4000, 10 sorties, qui assure un débit d'air de 2100 L/h. Pour éviter toutes contaminations, (i) les tuyaux d'aération sont branchés sur des filtres à air HEAP-VENT 0.33 µm et (ii) des anti-retours ont été placés juste en amont de leur extrémité, (iii) elle-même connectée sur une pipette stérile 1.5 ou 10 ml à usage unique.

La culture des algales se déroule en trois étapes.

L'étape préliminaire est la gestion des cellules souches à partir desquelles des ballons de 1 litre serontensemencés.

Création des tubes souches

Dans une bouteille autoclavée de 200 mL, 200 µL de solution de Conway et 20 µL de solution vitaminique (vitamine B12) ont été déposés dans 200 mL d'eau de mer en provenance d'AQUACAUX préalablement autoclavé.

Déposé 10 mL de ce milieu de culture dans un tube à essai de 50 mL. Complété par la suite avec 10 mL d'une souche algale provenant d'une algothèque ou le cas échéant d'AQUACAUX.

Par la suite les tubes à essai ont été fermés par du coton cardé préalablement autoclavé. Les tubes souches sont conservés dans la pièce réservée à la culture des algues.

Ces tubes souches vont permettre l'ensemencement de ballon de 1L toutes les semaines, ceci est la deuxième étape.

Ensemencement des ballons de 1 L

Au préalable, 900 mL d'eau de mer précédemment autoclavée a été déposée. Puis, 100 mL de milieu de conway et 100 µL de vitamine B 12 y ont été rajouté.

Dans ce milieu de culture, 10 mL de cellule souche ont été additionnée. En parallèle, les tubes souche sont régénérés en complétant leur volume avec 10 mL de milieu de culture.

Dans les ballons une pipette stérile de 10 mL est positionnée, puis le ballon est fermé avec du papier aluminium.

Enfin, le milieu est mis sous oxygénation intense dans la pièce algale.

La troisième étape de la culture d'algue consiste à l'ensemencement des gros volumes (10 L)

Ensemencement des gros volumes

Dans une bonbonne de 10 L, 10 L d'eau de mer préalablement autoclavée a été déposé. Dans ce volume, 10 mL de solution de Conway et 1 mL de vitamine B12 chacun filtré (22 µm) ont été ajouté.

Dans ce milieu, la moitié du ballon de 1 L a été déposé (relatif à la concentration en algue dans le ballon de 1 L).

Dans la bonbonne, une pipette stérile de 10 ml a été déposé et le milieu mis sous oxygénation intense dans la pièce prévu à cet effet.

Annexes 2 : Caractérisation des sédiments naturels de l'estuaire de Seine

Annexes 2.1

Composition physico-chimique des sédiments naturels de l'estuaire de Seine

La composition physico-chimique des sédiments naturels de l'estuaire de Seine a été effectuée par Julien Deloffre au laboratoire M2C de Rouen. Il n'apparaît aucune réelle différence puisque les sédiments sont dominés par une distribution granulométrique essentiellement concentrée dans les Limons (voir figure).

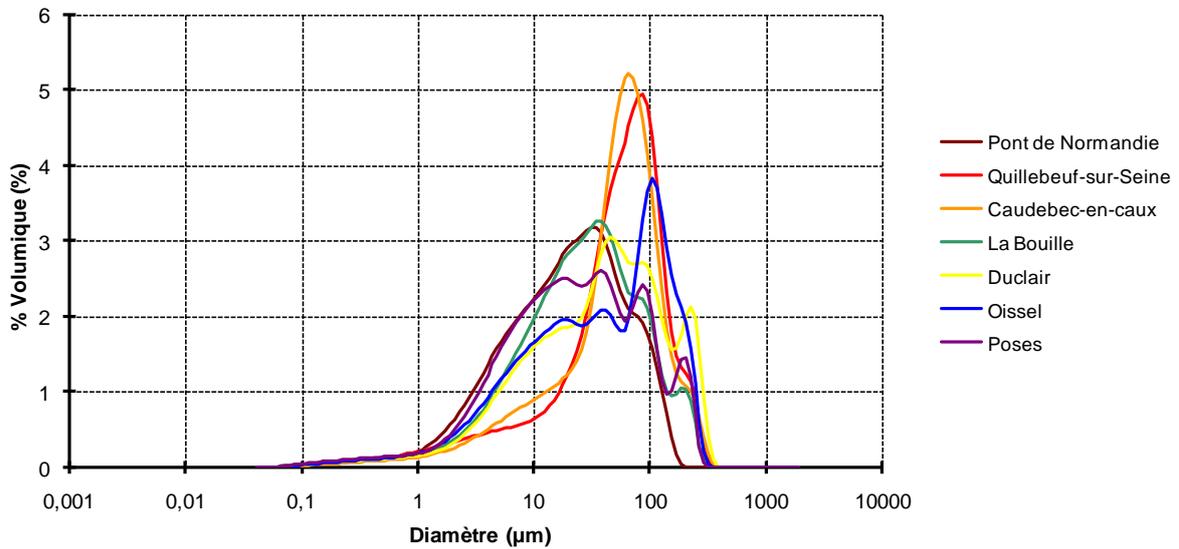


Figure 69 : Distribution des tailles de particules des sédiments naturels collectés en février 2009 en estuaire de Seine.

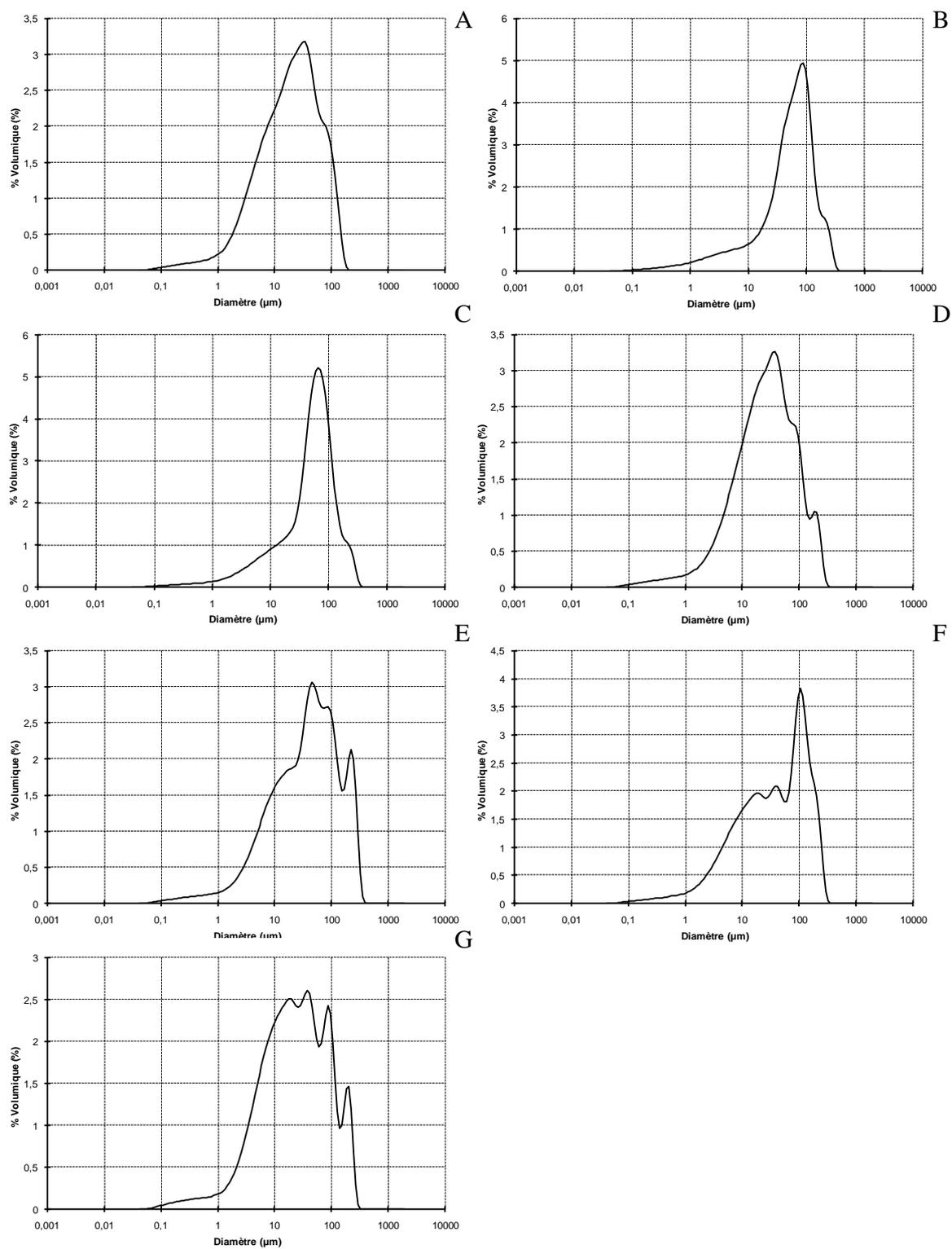


Figure 70 : Distribution des tailles de particules des sédiments naturels collectés en février 2009 en estuaire de Seine (A Pont de Normandie, B Quillebeuf-sur-Seine, C Caudebec-en-caux, D La Bouille, E Duclair, F Oissel, G Poses).

La composition chimique des sédiments naturels a également été évaluée. Les résultats sont présentés dans la figure. Il apparaît un fort taux de carbone dans les sédiments naturels de l'estuaire de Seine. Notamment il a été observé une augmentation de la quantité de carbone dans les sites proche du barrage de Poses.

Tableau 23 : Composition en carbone, hydrogène, azote et ratio C/N des sédiments naturels de l'estuaire de Seine collectés en février 2009.

	Carbone (%)	Hydrogène (%)	Azote (%)	C/N
Pont de Normandie	6.42	0.59	0.21	30.6
Quillebeuf-sur-Seine	4.91	0.24	0.18	27.3
Caudebec-en-caux	4.16	0.17	0.16	26.0
Duclair	7.60	0.38	0.19	40.0
La Bouille	9.82	0.96	0.45	21.9
Oissel	6.61	0.29	0.18	36.7
Poses	9.13	1.11	0.50	18.3

Annexe 2.2

Caractérisation de la contamination organique des sédiments naturels de l'estuaire de Seine

Le dosage des sédiments naturels a été effectué par l'équipe de Dr Hélène Budzinski du laboratoire de physico-chimie de Bordeaux 1.

La contamination des HAPs pour les différents sites analysés montre une forte contamination par les hydrocarbures de hautes masses moléculaires. Les hydrocarbures aromatiques de haute masse moléculaires étant plus particulièrement le phénanthrène et le benzo(a)pyrène représentant entre 5 et 15 % des HAPs totaux (figure).

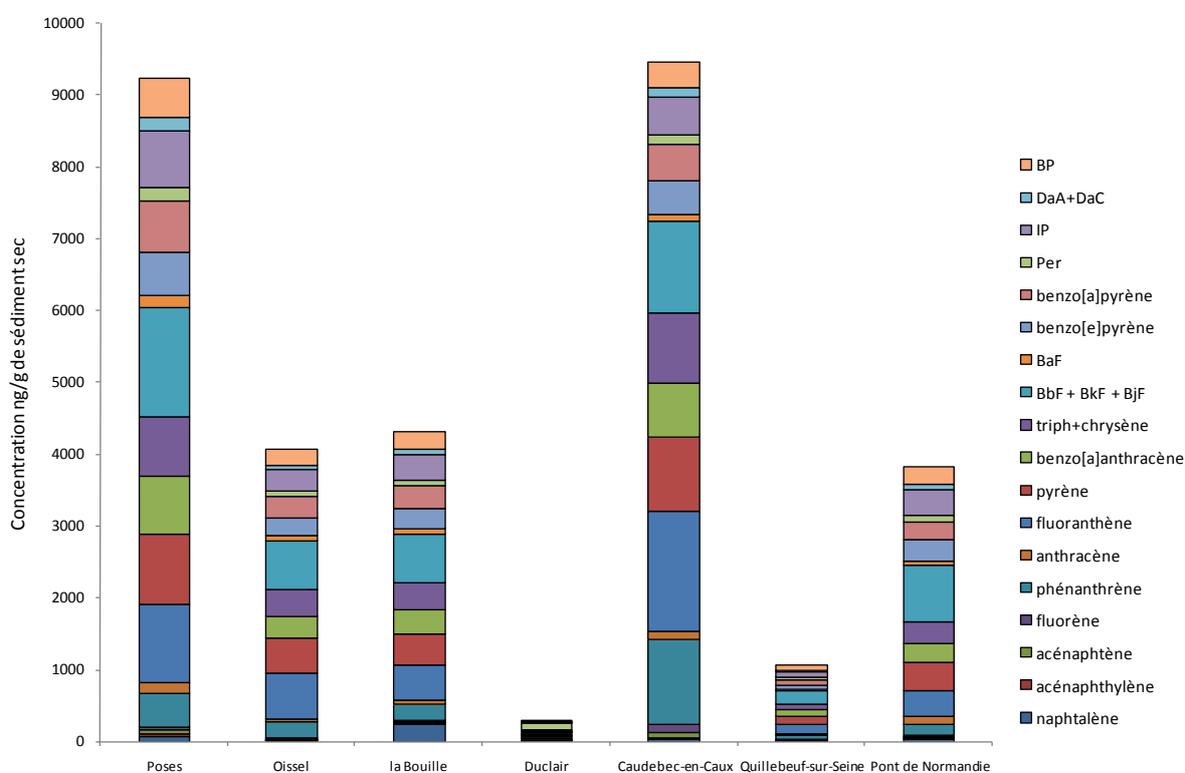


Figure 71 : Concentration en HAPs des sédiments naturels prélevés en février 2009 en estuaire de Seine.

Annexe 2.3

Caractérisation de la contamination métallique des sédiments naturels de l'estuaire de Seine

Le profil de la contamination métallique des sédiments naturels de l'estuaire de Seine est globalement similaire avec une dominante de manganèse (266 à 530 $\mu\text{g.g}^{-1}$) et de Plombs (autour de 100 $\mu\text{g.g}^{-1}$).

Tableau 24 : Contamination métallique des sédiments naturels prélevés en février 2009 en estuaire de Seine.

	Poses	Oissel	la Bouille	Duclair	Caudebec-en-Caux	Quillebeuf-sur-Seine	Pont de Normandie
Ba	236,0	160,0	162,0	164,0	112,0	79,0	99,0
Bi	24,0	25,0	23,0	23,0	25,0	23,0	23,0
Cd	0,9	1,0	0,9	0,9	1,0	0,9	0,9
Cr	53,0	67,0	50,0	52,0	33,0	36,0	62,0
Cu	51,0	84,0	45,0	35,0	6,0	11,0	29,0
Li	38,0	36,0	18,0	50,0	13,0	17,0	23,0
Mn	455,0	530,0	290,0	522,0	266,0	295,0	357,0
Mo	4,7	4,9	4,6	4,6	5,0	4,5	4,7
Pb	62,0	101,0	54,0	51,0	9,0	16,0	36,0
Sr	207,0	213,0	186,0	219,0	222,0	218,0	273,0
V	42,0	46,0	24,0	63,0	19,0	26,0	47,0
Zn	202,0	269,0	156,0	65,0	36,0	52,0	106,0
Ni	23,0	20,3	18,9	27,6	6,5	10,4	18,2
Hg	0,5	0,6	0,3	1,7	1,6	0,2	0,5

Annexes 3 : Les bio-tests

Annexe 3.1

Mise au point du MELA

Le test MELA est un bio-essai développé par Ludovic Vicquelin au LPTC de Bordeaux. Le principe consiste à exposer des larves de medaka à différents sédiments enrobés avec des molécules modèles, et d'observer les effets post-natal sur différents critères tels que la croissance, et la survie.

Les résultats enregistrés montrent que seul le PCB 126 (37 ng.g^{-1}) possède une toxicité létale sur les larves de medaka, contrairement aux autres composés testés (figure).

Concernant la croissance, le DMBA et le PCB 126 ont un effet significatif sur le développement larvaire du medaka à partir des concentrations de 88 et 37 ng.g^{-1} respectivement (figure).

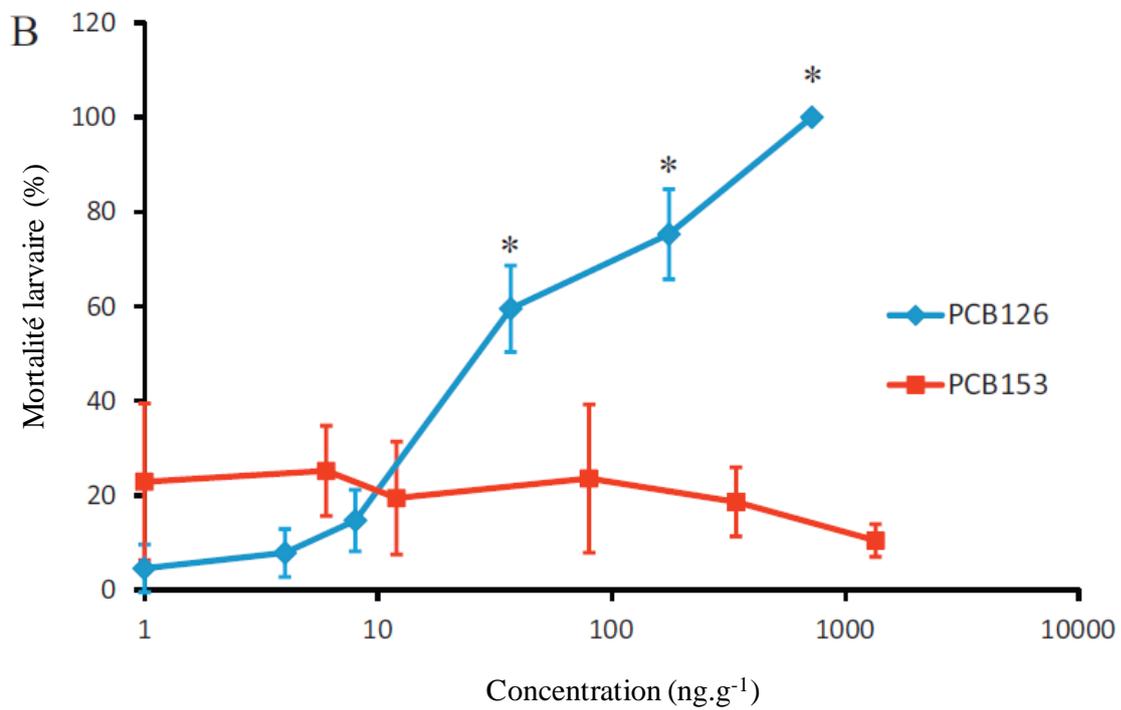
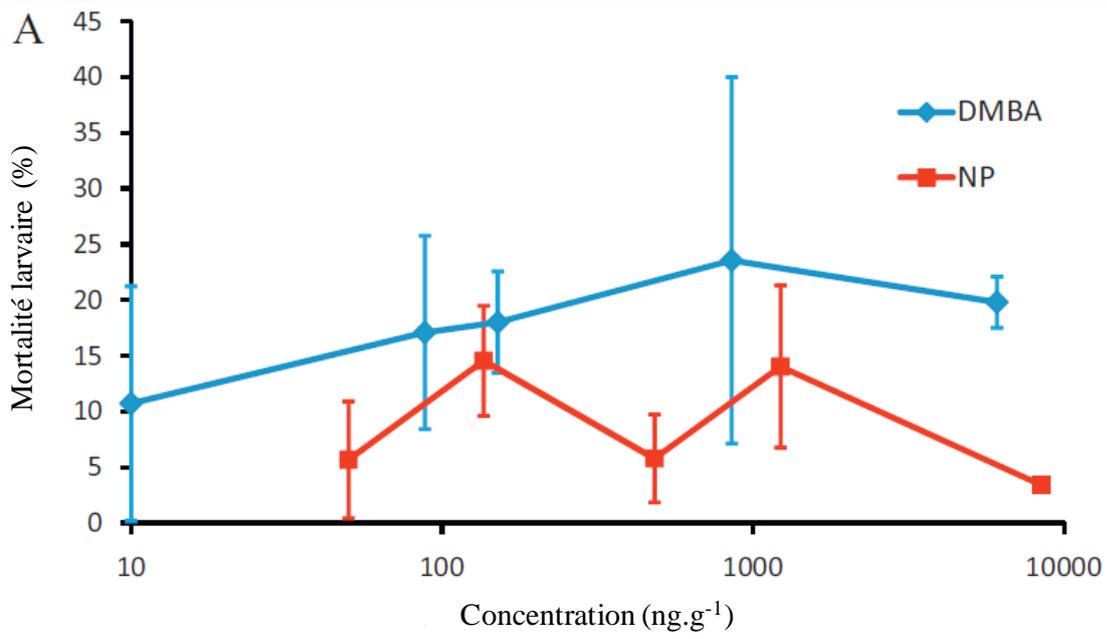


Figure 72 : Survie larvaire chez le medaka japonais exposé pendant 10 jours à des sédiments enrobés (A, DMBA et NaP ; B, PCB 126 et PCB 153). Astéris indique une différence significative par rapport au contrôle ($p < 0,05$, test de Tukey).

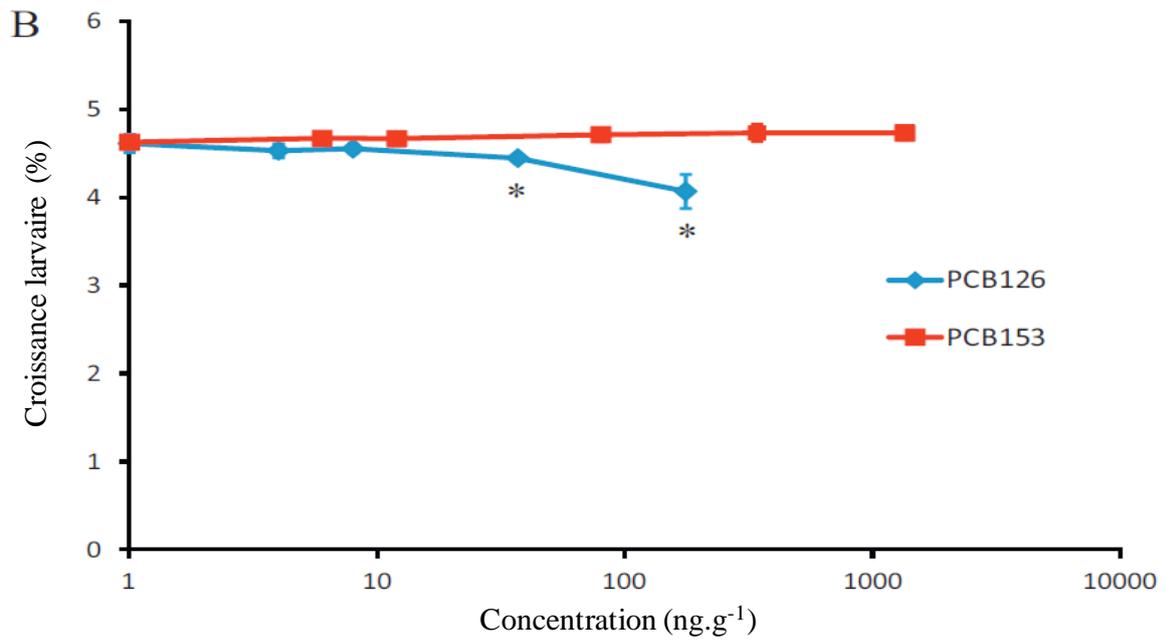
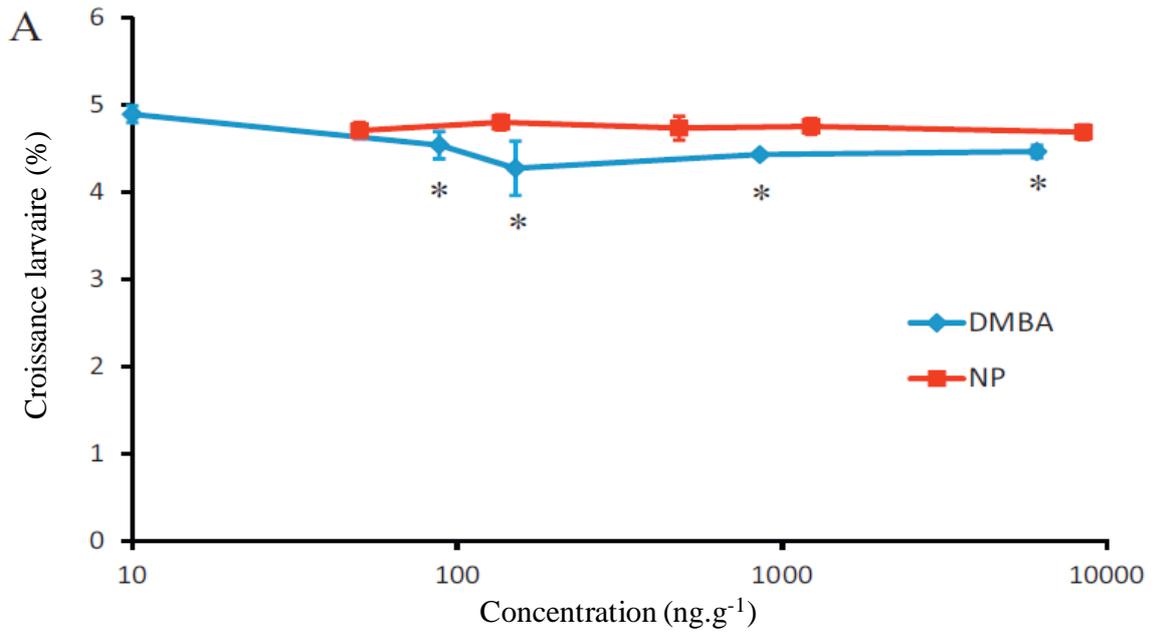


Figure 73 : Croissance larvaire chez le medaka japonais exposé pendant 10 jours à des sédiments enrobés (A, DMBA et NaP ; B, PCB 126 et PCB 153). Astérisque indique une différence significative par rapport au contrôle ($p < 0,05$, test de Tukey).

Annexe 3.2

Application du MELA

Le test MELA a également été appliqué afin d'évaluer la toxicité des sédiments de l'estuaire de Seine. Les résultats montrent une hausse significative de la mortalité chez les larves exposées aux sédiments de la Bouille, Oissel et Poses de respectivement 57, 15 et 15 % (figure A).

Concernant la croissance seules les larves exposées aux sédiments de Poses semblent avoir une croissance plus faible que chez les témoins avec une réduction de la taille de 0,23 mm par rapport au contrôle (figure B).

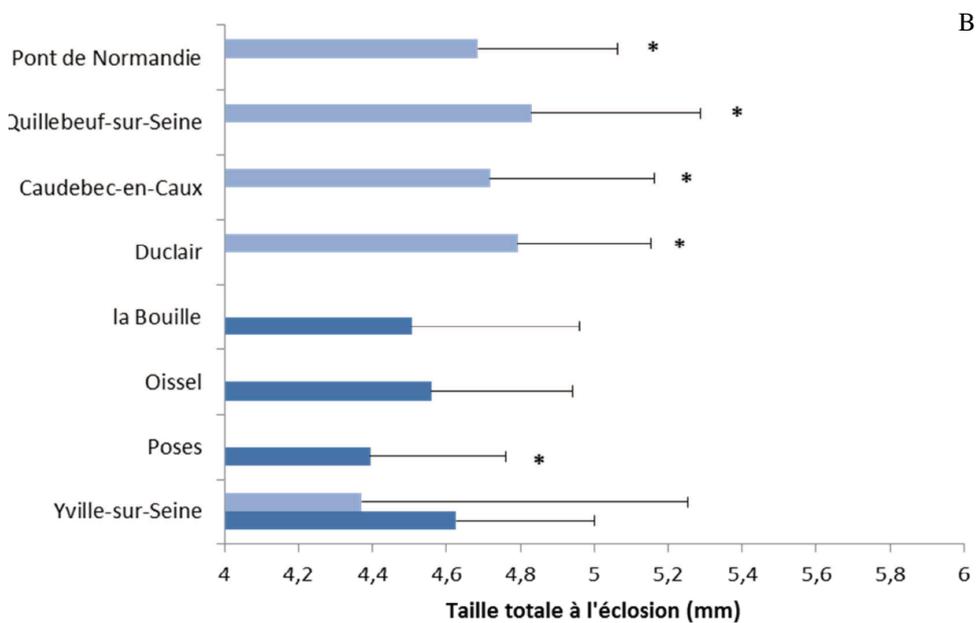
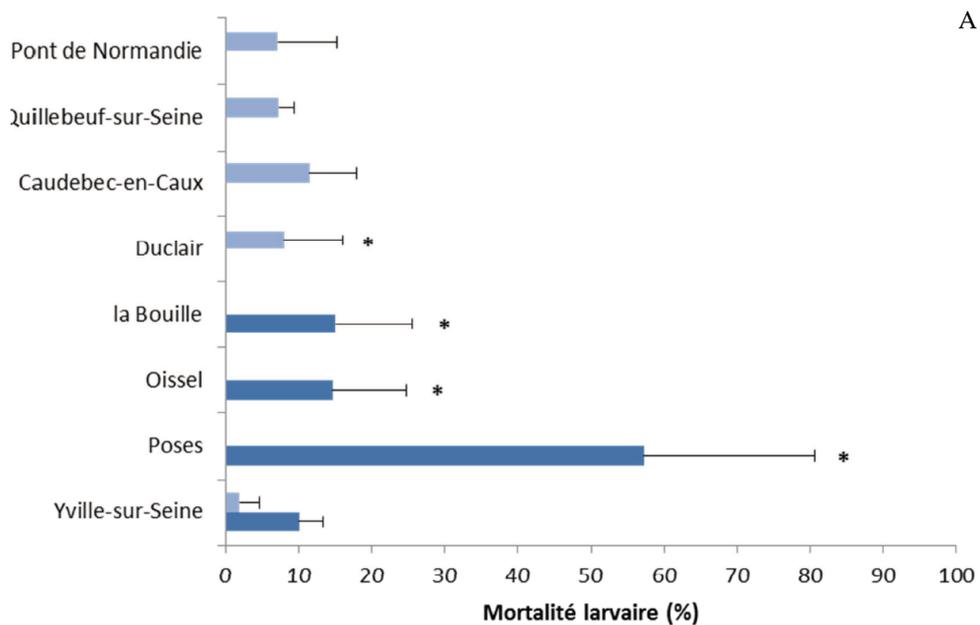


Figure 74 : Mortalité A et croissance B mesurée sur les larves de medaka à l'éclosion, suite à l'exposition à des sédiments naturels de l'estuaire de Seine (Bleu foncé estuaire amont, bleu clair estuaire aval). Astérisx indique une différence significative par rapport au contrôle ($p < 0,05$ test de Tukey)

Annexe 3.3

Test Corophium

L'institut Pasteur de Lille a réalisé un test de survie chez *Corophium arenarium*. La mortalité a été observée après 10 jours d'exposition aux sédiments naturels de l'estuaire de Seine. Les résultats sont présentés dans la figure.

Les résultats montrent que le site de Duclair s'est montré le plus toxique avec une hausse de la mortalité de près de 30 %. Parmi les autres sites, Pont de Normandie s'avère également montrer une toxicité avec une hausse de la mortalité de 20 %. Enfin, les autres sites semblent être moins toxiques avec une mortalité comprise entre 8 et 16 %.

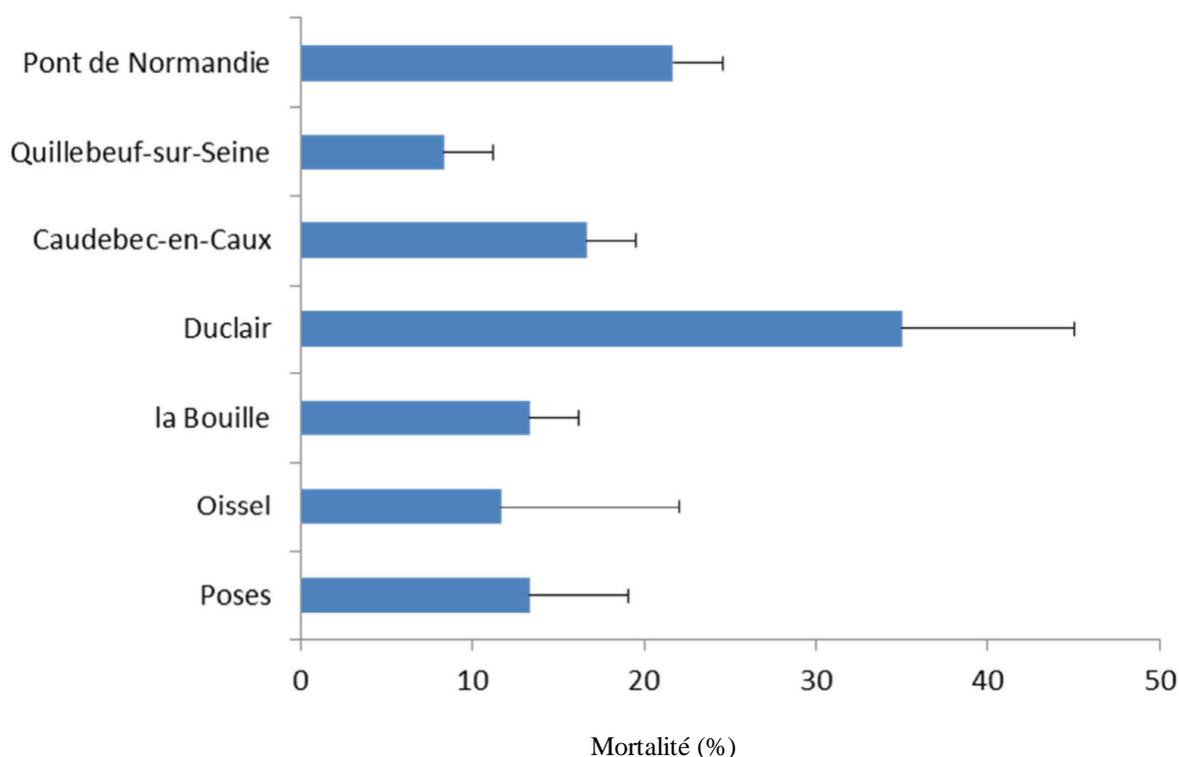


Figure 75 : Toxicité aigüe sur l'amphipode *Corophium arenarium*. Les résultats sont exprimés en pourcentage de mortalité observée.

Articles

Molecular characterization and mRNA expression of *grp78* and *hsp90A* in the estuarine copepod *Eurytemora affinis*

Benoit Xuereb · Joëlle Forget-Leray · Sami Souissi · Olivier Glippa · David Devreker · Teddy Lesueur · Sabine Marie · Jean-Michel Danger · Céline Boulangé-Lecomte

Received: 1 September 2011 / Revised: 9 December 2011 / Accepted: 3 January 2012
© Cell Stress Society International 2012

Abstract The present study aimed to develop a method of quantification of heat shock protein transcript levels in the estuarine copepod *Eurytemora affinis*. For that, the full-length cDNA of the 78-kDa glucose-regulated protein (*Ea-grp78*) and the cytosolic 90-kDa heat shock protein (*Ea-hsp90A*) from this species have been cloned. These cDNA revealed, respectively, 2,370 and 2,299 bp with 1,971 and 2,124 bp open reading frames encoding 656 and 707 amino acids. Main features, sequence identities and phylogenetic analysis with other species were described. Then, the expression profiles were analysed using reverse transcription/real-time quantitative PCR method from copepods subjected to different thermic and osmotic stresses in laboratory, and from copepods directly sampled into the natural population of the Seine Estuary (France) along a salinity gradient. Thermic shock (7.5°C, 22.5°C and 30°C during 90 min) significantly induced increases of transcript quantities

ranged between 1.7- and 19.7-fold the levels observed in control conditions (15°C). Hypo- and hyper-osmotic shocks (salinities of 1 and 30 during 90 min) caused a 2-fold induction of *Ea-hsp90A* transcript level in comparison to controls (salinity of 15) whereas no significant change was measured for *Ea-grp78*. On the other hand, similar expression profiles were observed for the two transcripts after 72 h of exposition to salinities of 1 and 25 with a significant 2-fold induction observed for the lower salinity. To finish, strong expression inductions of both *Ea-grp78* and *Ea-hsp90A* genes were observed in field copepods sampled at low salinity during the campaigns of June 2009 and May 2010. These results tend to show that the low salinity and the increase of temperature seem to have a synergic effect on stress condition of copepods.

Keywords Abiotic stress · Copepod · Estuary · Glucose-regulated protein 78 · Heat shock protein 90

B. Xuereb (✉) · J. Forget-Leray · T. Lesueur · S. Marie · J.-M. Danger · C. Boulangé-Lecomte
Faculté des Sciences et Techniques du Havre, Laboratoire d'Ecotoxicologie-Milieux Aquatiques (UPRES EA3222), Fédération SCALE 4116, GDR Ifremer-INRA EXECO, 25 Rue Philippe Lebon, 76058 Le Havre, France
e-mail: benoit.xuereb@univ-lehavre.fr

S. Souissi · O. Glippa · D. Devreker
Université Lille Nord de France,
59000 Lille, France

S. Souissi · O. Glippa · D. Devreker
USTL, LOG, Station Marine de Wimereux,
62930 Wimereux, France

S. Souissi · O. Glippa · D. Devreker
CNRS, UMR 8187,
62930 Wimereux, France

Introduction

The capacity to cope with the insults of environmental physical and chemical fluctuations is an essential process, which directly impacts the biogeographical distribution and interaction of aquatic species. Nowadays, the understanding of variations of physiological traits over large spatial scales and the ecological significance of the observed variations are emerging as central questions in ecological physiology (Hofmann 2005). Under stress conditions, cellular functions and homeostasis are maintained through highly conserved cellular defence mechanisms. One of the most characterized stress responses is the induction of an evolutionally conserved set of polypeptides termed heat shock proteins (HSPs).

HSPs are a large group of molecular chaperones that are found from prokaryotes to vertebrates and higher plants. HSPs play an important role in transport, folding, unfolding, assembly and disassembly of multi-structured units and degradation of misfolded or aggregated proteins (Mayer and Bukau 2005 for review). These tasks are fundamental in many normal cellular processes; however, the need for molecular chaperones is accelerated under stressful conditions that could potentially damage cellular and molecular structures in cells. HSPs synthesis has been shown to be up-regulated in response to a wide variety of environmental insults such as thermal stresses, osmotic stresses, anoxia, ultraviolet light irradiation, exposure to inorganic and organic contaminants, as well as infection by pathogens (Mouneyrac and Roméo 2011; Sørensen et al. 2003 for review). Thus, HSPs are important for recovery and survival of organisms (Lindquist 1986). More globally, it has been suggested that HSPs can play an important role in the ecology and evolution of populations, notably for organisms inhabiting variable environments, making them interesting biomarkers of stress for ecological physiology approaches (Sørensen et al. 2003).

HSP70s and HSP90s are considered as the major chaperones and constitute the most studied HSP families in eukaryotes. In most of eukaryotic cells, three forms of HSP70s as well as HSP90s exist with different functions and intracellular locations, i.e. mitochondrial or chloroplast organelles, endoplasmic reticulum (ER) lumen and cytoplasm (Chen et al. 2005a; Karlin and Brocchieri 1998). The mitochondrial and chloroplastic forms of HSP70s and HSP90s are more closely related to their respective prokaryotic counterparts, DnaK and Htpg, than the others eukaryotic forms. GRP78 (78-kDa glucose-regulated protein, also referred to immunoglobulin binding protein BiP) and GRP94 (94-kDa glucose-regulated protein, also referred to HSP90B) are the ER paralogs of HSP70 and HSP90, respectively. GRP78 is evolutionary conserved from yeast to humans, whereas GRP94 has only been identified in vertebrates (Lee 2001 for review). GRPs play notably a key role in the unfolded protein response (UPR): an adaptive process which takes place in response to ER homeostasis disruptions such as accumulation of misfolded proteins, Ca^{2+} depletion or oxidative stress. The cytosolic forms can be divided into the constitutive and inducible subgroups. Then, in large part of eukaryotic organisms, the heat shock cognate (HSC) proteins 70 that are expressed constitutively and are involved in normal cellular processes can be distinguished from the inducible HSP70, which are produced under stress conditions. In vertebrates, two cytosolic forms of HSP90, HSP90AA (inducible form) and HSP90AB (constitutive form), equally exist and are likely to result from a gene duplication which occurred approximately 500 million years ago (Chen et al. 2005a).

Estuarine aquatic wildlife and particularly zooplanktonic community appears as an interesting model system to

investigate the role of physiological processes such as the HSP synthesis on the ecology of species. Indeed, estuaries are complex ecosystems, which are subjected to marked physicochemical small-scale changes (mainly salinity, turbidity and current flow) associated with tidal cycles and to large-scale seasonal variations (essentially temperature). Capacity of aquatic organisms to tolerate those environmental variations determines their spatio-temporal repartition along the estuarine gradient and their capacity to survive and to overlap low tolerant-species in such a stressful environment (Laprise and Dodson 1994). The calanoid copepod *Eurytemora affinis* is known to have physiological capacities to invade freshwater environment through the saline gradient of estuaries (Lee 1999; Lee and Peterson 2003). As a result, this species is distributed in a large spectrum of habitats characterized by large range of salinity, from hyperhaline salt marches to lakes and is one of the most common copepods of the northern hemisphere estuaries (Lee 1999). In the Seine Estuary (France), *E. affinis* dominates the zooplankton community during most of the year in the oligohaline and mesohaline zones (salinity from 2.5 to 18) and can frequently be found in the polyhaline zone (salinity from 18 to 30; Devreker et al. 2008; Mouny and Dauvin 2002). *E. affinis* plays a key role in the food web of the low salinity zone of the Seine Estuary by being one of the principal consumers of phytoplankton and detritus and the most abundant prey for mysids, shrimp and fish (Dauvin and Desroy 2005). Due to its ecological interest, several works have investigated the effects of environmental factors on *E. affinis* life traits, its geographical distribution and/or its interactions with others species (Beyrend-Dur et al. 2009; Devreker et al. 2009; Kimmel et al. 2006 for example). However, much less is known about physiological events occurring at lower biological levels. Only some studies reported the influence of temperature and osmotic stress on pattern of total protein and/or HSP expression in this species (e.g. Gonzalez and Bradley 1994; Hakimzadeh and Bradley 1990; Kimmel and Bradley 2001). Although traditional methods of protein expression analysis employed in these studies are relevant approaches to elucidate the mechanism of HSP regulation and expression, they rarely allow discriminating the different forms of HSP (ER, cytosolic, inducible or constitutive) and they generally require an important quantity of organisms. An alternative and complementary approach is the use of transcriptomic methods based on the detection of mRNA. These methods, which benefit from the specificity and sensitivity of polymerase chain reaction (PCR)-based procedures, make it possible to investigate the role of genes coding for HSPs in greater details. In addition, very little sample material is needed, making the study of small organisms such micro-crustaceans easier. However, these methods require that the complementary DNA (cDNA) of interest genes have been cloned. To

date, the cDNA of HSP70 and HSP90 forms have been cloned from only one copepod species i.e. the marine harpacticoid *Tigriopus japonicus* (Rhee et al. 2009). More generally, as underlined by Luan et al. (2010), few reports exist on crustacean species.

In this context, the quantification of *hsp* gene expression in estuarine copepod species such as *E. affinis* presents a real interest for ecological physiology practices at large spatial scales and could contribute to better understand the role of HSPs for ecology and evolution of these cryptic populations. The present study is a first step, which aims to develop a method of quantification of *hsp* gene expression in *E. affinis* with a view to future applications in ecological physiology. The investigation was focused on forms of HSP90 and HSP70 families. We implement here the data on stress proteins in copepods: (1) the cDNA sequences encoding *grp78* and *hsp90A* transcripts in *E. affinis* were cloned and characterized (designed *Ea-grp78* and *Ea-hsp90*), (2) their expression pattern were analysed by reverse transcription/real-time quantitative PCR (RT-qPCR) from copepods subjected to different thermic and osmotic stresses in laboratory and (3) from copepods directly sampled into the natural population of the Seine Estuary along a salinity gradient.

Materials and methods

E. affinis sampling and culture

Several sampling were conducted in the Seine Estuary (Haute-Normandie, France) from 2009 to 2010. *E. affinis* individuals were collected along salinity gradient in the estuarine turbidity maximum zone using horizontal plankton net (200 μm mesh size) from the RV *Côtes de la Manche* (Fig. 1). The field salinity and temperature conditions of different sampling are detailed in Table 1. Immediately after sampling,

a fraction of copepods was directly conditioned for RT-qPCR applications; the rest was transferred into containers filled with filtered estuarine water and brought back to be cultured in perspectives of laboratory experiments (see the “[Analysis of expression patterns: effect of water temperature and salinity, and preliminary field approach](#)” section). In the last case, culture was performed on the basis of procedure described in Devreker et al. (2009). Copepods were reared in 40-L aquariums filled with artificial brackish water at salinity 15 (a mixture of UV-treated filtered (1 μm) sea water and deionised water) under constant aeration. Photoperiod and temperature were maintained at 12:12 h light/dark and $15 \pm 1^\circ\text{C}$, respectively. Copepods were fed every 2 days with a mixture of *Rhodomonas marina* (15 μm diameter) and *Isochrysis galbana* (4.5 μm diameter) at a ratio of 2:1 (cell/cell) for a total of approximately $20,000 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$. Algae cultures were grown at 20°C in 10 L tanks under 24 h fluorescent illuminations in Conway medium. Water was renewed every 3 weeks. Animals were kept in these conditions during an acclimation period of at least 3 weeks before use for experiments.

Total RNA isolation and cDNA synthesis

Samples were grinded using micro-pestles (Eppendorf, Lelec, France), during 3 freeze/thaw cycles in liquid nitrogen, and then homogenized in 250 μL of nuclease-free ultra-pure water (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Total RNAs were extracted using Tri-Reagent LS (Euromedex, Mundolsheim, France) according to the method described in Xuereb et al. (2011). To remove any potential contamination with genomic DNA, RNA were digested and purified with TURBO DNA-free[®] kit (Ambion Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer’s instructions. RNA concentrations and purity were measured using a NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Tehnologies, ThermoScientific, Wilmington, USA), and sample integrity was

Fig. 1 Map of the sampling location in the lower part of the Seine Estuary. Sampling zone is hatched and the black points indicate the principal cities

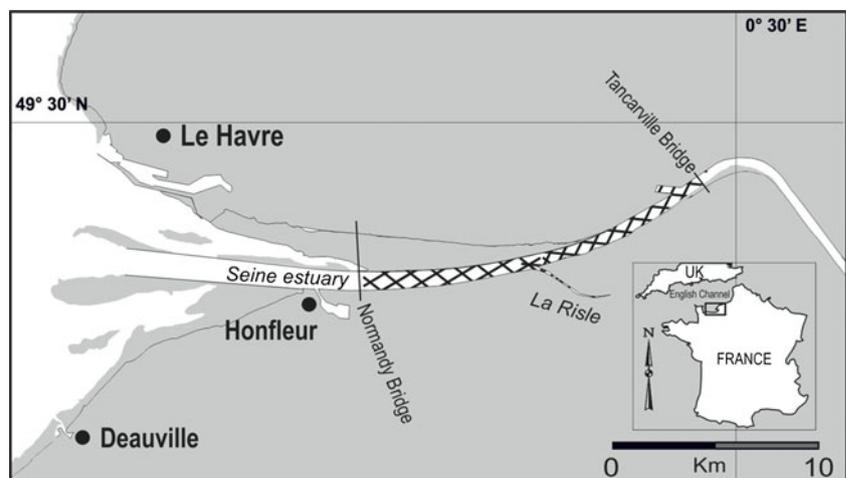


Table 1 Values of water salinity and temperature (in °C) recorded along the salinity gradient of the Seine estuary during the sampling campaigns in April and June 2009 and May 2010, and corresponding levels of *Ea-hsp90A* and *Ea-grp78* transcripts measured in pools of 50 adult *E. affinis*

Sampling date	Water characteristics		Transcript levels	
	Salinity	Temperature	<i>Ea-hsp90A</i>	<i>Ea-grp78</i>
April 29, 2009	4.2	15.4	243,995±76,075 ^a	6,523±1,881 ^a
	9.9	15.3	326,155±139,085 ^{a,b}	11,768±4,974 ^{a,b}
	14.5	14.3	382,700±110,438 ^{a,b}	13,589±5,211 ^{a,b}
	20.2	13.6	329,344±107,832 ^{a,b}	15,607±6,323 ^{a,b}
June 27, 2009	0.5	20.0	942,658±232,941 ^b	50,608±18,380 ^b
May 31, 2010	4.8	16.6	890,069±443,966 ^b	61,569±34,746 ^b
	10.0	16.3	606,775±166,061 ^b	28,620±5,519 ^{a,b}
	14.1	15.9	591,328±295,756 ^{a,b}	11,802±6,468 ^{a,b}

Data of transcript level are reported as mean±standard deviation of cDNA copy number ($n=5$). Similar letters indicate no significant difference ($p>0.05$)

evaluated after RNA migration in a 2% agarose gel electrophoresis, before storage at -80°C . Samples exhibited no RNA fragmentation and had 260:280 nm ratios upper than 1.8. Messenger RNA (*mRNA*) contained in 1 μg of total RNA were reverse transcribed to complementary first-strand DNA (cDNA) with M-MLV reverse transcriptase Rnase H minus (Promega, Charbonnières, France) using oligo(dT)₂₀ in presence of Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega) according to the method described in Xuereb et al. (2011). Finally, cDNAs (40 μL) were diluted in 60 μL of ultra-pure water and stored in 5 μL aliquots at -20°C .

cDNA cloning and characterization

Degenerate primers (DP) were designed from *hsp70* and *hsp90* cDNA sequences available on the GenBank database by using Primer 3 v.0.4.0 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>; Table 2). PCR was performed using DyNAzyme™ II PCR master mix (Finnzymes, Espoo, Finland) under the following conditions: $95^{\circ}\text{C}/4$ min; 45 cycles of $95^{\circ}\text{C}/30$ s, 50°C or $55^{\circ}\text{C}/45$ s, $72^{\circ}\text{C}/1$ min; and $72^{\circ}\text{C}/5$ min. The amplified PCR products were isolated from 1.2% agarose gel,

cloned into pGEM®-T Vector System (Promega) and transformed into competent *Escherichia coli* cells XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam, the Netherlands). Sequencing was performed by the MilleGen® company (Labège, France) with ABI3130XL sequencer (Applied Biosystems) by using Big-Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Membership of the PCR products to the *hsp70* and *hsp90* gene families was verified by Blast analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

The full-length cDNA of *E. affinis hsp70* and *hsp90* were obtained by RACE PCR using Marathon™ cDNA Amplification Kit (Clontech, Saint Germain en Laye, France) according to the user's manual. The 5'- and 3'-RACE products were amplified by PCR using gene-specific primers (GSP) specially designed and Adaptor Primer (AP) supplied with the RACE PCR Kit (Table 2). The PCR cycling parameters were as follows: $94^{\circ}\text{C}/30$ s; 5 cycles of $94^{\circ}\text{C}/15$ s, $62^{\circ}\text{C}/1$ min and $72^{\circ}\text{C}/3$ min; 5 cycles of $94^{\circ}\text{C}/15$ s, $62^{\circ}\text{C}/1$ min and $70^{\circ}\text{C}/3$ min; 25 cycles of $94^{\circ}\text{C}/15$ s, $62^{\circ}\text{C}/1$ min and $68^{\circ}\text{C}/3$ min; and $72^{\circ}\text{C}/10$ min. The final PCR products were both isolated from agarose gel and sequenced, as described above, by the MilleGen®

Table 2 Primers used for degenerate and RACE PCRs

Step	Oligo name	Sequence (5'–3')
Degenerate PCR	DP- <i>hsp70</i> .F	CTTAYGGGTTSGACAAGAA
	DP- <i>hsp70</i> .R	ATCTTGGGGATRCGRGTGG
	DP- <i>hsp90</i> .F	GAGACCTTYGCVTTYCAGG
	DP- <i>hsp90</i> .R	GTTDCCCACYCCRAAYTGNC
RACE	GSP- <i>hsp70</i> .3'F	GTACCTTTGATGTCTCTGCTCACC
	GSP- <i>hsp70</i> .5'R	CGGGCTTCAGGGTCCACGGAACAGGTCCA
	GSP- <i>hsp90</i> .3'F	CGCGTTCAGGCCGAGATTGCACAGCTT
	GSP- <i>hsp90</i> .5'R	ACTAATATCAGCTCCGGCCTGAAGAG
	AP	CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC

AP adaptor primer, DP degenerated primer, GSP gene specific primer

company. The sequences obtained after 5'- and 3'-RACE were assembled using Geneious ProTM v5.3 software.

The structural analysis of full-length cDNA sequences was performed using online softwares. The open reading frames (ORF) of the cDNA were determined using ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). Theoretical protein molecular mass and isoelectric points were predicted using compute pI/Mw tool (http://expasy.org/tools/pi_tool.html). The putative signal peptide was researched using SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP). Scans for known amino acid motifs were performed against Prosite and Pfam database (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan).

The phylogenetic analysis was performed after global alignment of amino acid *E. affinis* sequences with counterparts from 35 and 8 crustacean species for GRP78 and HSP90, respectively. All sequences were collected from the GenBank database. The tree was constructed by Jukes–Cantor genetic distance model and neighbour-joining method using Geneious v5.4 software (Drummond et al. 2011). Blosum62 was used as the cost matrix. The gap open and gap extension penalties were 12 and 3, respectively. HSP70 and HSP90 trees were respectively rooted using *Vibrio proteolyticus* DNAK and *Mytilus galloprovincialis* HSP90 as outgroups. The analysis of HSP amino acid conservation was conducted comparing percent identities generated from pairwise alignments (EMBOSS, European Bioinformatics Institute).

Analysis of expression patterns: effect of water temperature and salinity, and preliminary field approach

Laboratory experiments The effects of temperature and salinity on the expression of characterized *hsp* genes were individually assessed under controlled laboratory conditions. During a first experiment, copepods were exposed to thermic or osmotic shocks during 90 min. Adult copepods of mixed gender ($n=300$ per replicate) were placed into 50-mL plastic tubes ($n=3$) for each tested conditions (control and treatments). The control copepods were maintained in optimal temperature (15°C) and salinity (15) conditions (Devreker et al. 2007; 2009). Three thermic shocks (7.5°C, 22.5°C and 30°C at the optimum salinity) and 2 osmotic shocks (salinities of 1 and 30, at the optimum temperature) were tested. In a second experiment, copepods were exposed during 72 h in 3 different salinities (1, 15 and 25), at the optimal temperature condition, in 40-L aquariums. This experiment was performed under the same light and aeration conditions as in the main culture (see the “*E. affinis* sampling and culture” section). At the end of exposure, for both experiments, copepod pools of about 250 adults ($n=3$ per condition) were recovered by sieving (200 µm mesh size), quickly rinsed with ultra-pure water and placed in sterile microtubes before freezing in liquid nitrogen and

storage at –80°C until RNA extraction (see the “Total RNA isolation and cDNA synthesis” section).

Field experiment The spatio-temporal variability of the studied *hsp* gene expression was assessed within the natural *E. affinis* population of the Seine Estuary. Copepods were sampled along the salinity gradient on April 29 and June 27, 2009 and May 27, 2010 (Fig. 1; Table 1) as described in the “*E. affinis* sampling and culture” section. It can be underlined that copepods were found only at the salinity of 0.5 in June 2009 and no copepods were found at salinities upper to 14.1 in May 2010. Immediately after sampling, pools of 50 copepods ($n=5$ per sampling point) were constituted by gentle pipetting to maximise the specific selection of adult *E. affinis* (males and females in sexual rest), placed in microtubes and quickly rinsed in ultra-pure water before freezing in liquid nitrogen. At the laboratory, samples were stored at –80°C until RNA extraction (see the “Total RNA isolation and cDNA synthesis” section).

Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) The specific primer sets used for qPCR (Table 3) were designed using the “Universal Probe Library” software (Roche Diagnostics). qPCR was carried out in duplicate on the Rotor-Gene Q 2-plex HRM (Qiagen, Courtaboeuf, France) using the QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Kit (Qiagen), in 20-µL volume containing 5 µL of cDNA sample, 4 µL of ultra-pure water, 1 µL of primers (forward and reverse; 10 µM) and 10 µL of QuantiTect Master Mix 2X. Blank controls were performed for each qPCR run to check the absence of contamination by DNA in reagents. After initial denaturation at 95°C/15 min, cDNA were amplified for 45 cycles of 94°C/15 s, 59°C/20 s and 72°C/15 s. Following the last PCR cycle, all cDNA were denatured by a rapid increase to 95°C and hybridized again for 20 s at 68°C. The melting curve was finally determined during a slow temperature elevation from 55°C to 99°C (0.2°C s⁻¹). The specificity of PCR products was checked by melting curve analysis and by 1.2% agarose gel electrophoresis. The expression levels of target genes were calculated according to the absolute quantification method (Chen et al. 2005b; Nadam et al. 2007; Wong and Medrano 2005). The values of quantification cycle (C_q; cycle number from which fluorescence is detected above the noise threshold) were collected with Rotor-Gene Q series software (Qiagen) using the comparative quantification method. To convert C_q values into cDNA copy number quantified from 5 µL-aliquot of RT product, a specific standard curve was established for each primer pair from 10-fold serial dilutions of purified PCR products (from 10⁹ to 10¹ cDNA copies; in triplicate). For that, a cDNA sample was amplified with HotStar HiFidelity DNA Polymerase (Qiagen) according to the user’s manual and purified with QIAquick PCR[®] Purification Kit (Qiagen). cDNA concentration was determined with a NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer

Table 3 Primers used for qPCR

Oligo name	Sequence (5'-3')	Amplicon size	Standard curve	PCR efficiency
qPCR- <i>grp78.F</i>	AAGCCCGTCCAGAAGGTT	71 nt	$y=-4.0274x+43.546$	1.771
qPCR- <i>grp78.R</i>	CCAACAAGAACAATCTCGTCAA		$R^2=0.999$	
qPCR- <i>hsp90A.F</i>	AGATATGAATCCCTCACTGATGC	68 nt	$y=-4.0119x+43.187$	1.775
qPCR- <i>hsp90A.R</i>	GGGATGAGTTTTGATGTACAGACC		$R^2=0.999$	

and dilution series were performed in ultra-pure water. A dilution of medium range (corresponding to 10^5 cDNA copies), defined as standard points, was distributed in 5- μ L aliquots and stored at -20°C . This standard point was systematically amplified during the qPCR runs to confirm the reliability of amplification reading and to correct Y-intercept of standard curve equation. The equation and R^2 of standard curve, and PCR efficiency ($E=10^{-(1/\text{slope})}$) of each target genes are presented in Table 3.

Statistics Statistical procedures were carried out with the Statistica software v7 (Statsoft). Considering small sample size, only non-parametric analyses are reported here. For the laboratory experiments, we focused on the differences between the control (i.e. optimal condition) and each treatment condition. Concerning thermic treatments, the global differences were tested using non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA rank sum tests ($p<0.05$), then two-sample comparisons were performed using Unilateral Mann–Whitney rank sum tests ($p<0.05$). For salinity treatments, control condition was compared to only two “extreme” treatments. So statistical analysis focused on the two-sample comparisons were performed using Unilateral Mann–Whitney rank sum tests ($p<0.05$). Concerning the field experiment, inter-group differences were assessed using non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA and multile comparison rank sum tests ($p<0.05$).

Results

Identification and analysis of full-length cDNA sequences

Degenerate primer pair DP-*hsp70.F*/DP-*hsp70.R* generated a fragment of 473 bp. Blast analysis confirmed that the fragment was a part of a *hsp70* gene sequence. The 2,370 bp full-length cDNA sequence was secondary obtained by 5'- and 3'-RACE PCR (GenBank accession number, JF811334). It contained a 1,971-pb ORF encoding a 656-amino acid polypeptide, a 5'-terminal untranslated region (UTR) of 67 bp, and a 3'-UTR of 332 bp including a stop codon (TAA), two signal sequences for polyadenylation (AATAAA) and a poly(A) tail (Fig. 2). The deduced amino acid sequence has a calculated molecular mass of 72.04 kDa and a theoretical isoelectric point of 4.89. The possibility of false prokaryotic cloning was excluded since

the consensus motif “GPKH” identified by Karlin and Brocchieri (1998) among all prokaryote and mitochondrial HSP70 sequences, is absent in the sequence. The Signal P software detected a signal peptide of 15 amino acids (MKVLILLSAVMAVFG). Motif scan analysis showed that the predicted amino acid sequence displays all three conserved HSP70 protein family signatures, [IV]-DLGT-[ST]-x-[SC] (residues 30–37; Prosite ID *HSP70_1 PS00297*), [LIVMF]-[LIVMFY]-[DN]-[LIVMFS]-G-[GSH]-[GS]-[AST]-x(3)-[ST]-[LIVM]-[LIVMFC] (residues 216–231; Prosite ID *HSP70_2 PS00329*), and ([LIVMY]-x-[LIVMF]-x-GG-x-[ST]-[LS]-[LIVM]-P-x-[LIVM]-x-[DEQKRSTA] (residues 355–370; Prosite ID *HSP70_3 PS01036*). A motif very similar to ATP/GTP-binding site motif A (P-loop; prosite ID *ATP_GTP_A PS00017*), AEAYLGKK, is located at amino acid residues 153–160. The C-terminal consensus ER signature, [KH]-DEL, is present at position 653–656. Phylogenetic analysis of crustacean HSP70 sequences is presented in Fig. 3. Two groups of sequences are clearly bringing to light by high phylogenetic distance. The most represented group corresponds to the cytosolic form of HSP70. It could be subdivided into three sub-groups: the decapod inducible form (identified as Decapod HSP70), the decapod constitutively expressed form (identified as Decapod HSC70) and the non-decapod sequences (identified as Non-decapod HSP70). The second group, including *E. affinis* sequence, would correspond to the ER form of HSP70 (i.e. GRP78), since all sequences contained a signal peptide and the C-terminal consensus ER signature (i.e. KDEL). In agreement, pairwise alignment analysis indicated that HSP70 sequence characterized in *E. affinis* shares high identities with GRP78 amino acid sequences of the crustaceans *Daphniopsis tibetana* (85.37%; ADA79522.1) and *Fenneropenaeus chinensis* (83.74%; ABM92447.1), the insect *Drosophila melanogaster* (83.79%; NP_727563.1), the vertebrates *Mus musculus* (82.36%; NP_071705.3), *Gallus gallus* (82.06%;

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of GRP78 from *Eurytemora affinis*. Heat shock protein 70 family signature motifs are highlighted as shaded regions (positions 30–37, 216–231 and 355–370). The signal peptide (position 1–15), ATP-binding motif (position 153–160) and consensus signature of endoplasmic reticulum form are underlined (position 653–656). The polyadenylation signal sites are shown in the open boxes (position 653–656). The stop codon is indicated by a star

1 GCTTGATTCACTTCTAAAAAGAGTGGGTAGGTTAAATTTACAAGTGCCGTATACGGACAGT
 61 AAATAAAATGAAGGTTCTAATCCTTTTTATCGGCCGTGATGGCCGTTTTTCGGATCTGACGA
 1 M K V L I L L S A V M A V F G S D D
 121 TAAGAAGGAGGCTGATATTGGGACTGTGATTGGTATCGATCTTGGAAACCACCTATTCTTG
 19 K K E A D I G T V I G I D L G T T Y S C
 181 TGTTGGAGTGTTTAAGAACGGCAGAGTGGAGATTATTGCTAACGATCAGGGAAAACAGAAT
 39 V G V F K N G R V E I I A N D Q G N R I
 241 TACACCCAGCTACGTGGCATTACAGCTGACGGAGAAAGATTGATTGGAGATGCTGCCAA
 59 T P S Y V A F T A D G E R L I G D A A K
 301 AAATCAGCTGACAACTAACCCCTGAGAACACCGTGTTCGACGCTAAGCGACTGATTGGTCG
 79 N Q L T T N P E N T V F D A K R L I G R
 361 TGACTGGACCGACAAAACCTGTGCGCCAGCGACATGAAATACTTCCCCTTCAAGCTTGTGA
 99 D W T D K T V A S D M K Y F P F K L V E
 421 GAAGAATGCTAAGCCCCATATTACAGTTGAGACTAGCCAGGGACAGAAAACATTCGCCCGC
 119 K N A K P H I Q K N A K P H I Q K N A K
 481 AGAGGAAATCTCCGCCATGGTTCTGGTCAAGATGAAGGAAACTGCCGAGGCGTATCTTGG
 139 E E I S A M V L V K M K E T A E A Y L G
 541 CAAGAAGGTCAACCACGCCGTCTCACCGTCCCCGCCCTACTTTAACGACGCCAGAGACA
 159 K K V T H A V V T V P A Y F N D A Q R Q
 601 AGCTACCAAGGACGCCGGAGTCAATTGCTGGTCTAAATGTTATGAGGATTATCAACGAACC
 179 A T K D A G V I A G L N V M R I I N E P
 661 TACCGCTGCTGCCATCGCTTACGGTATGGCAAGAAGGATGGAGAGAAGAATGTCTTGT
 199 T A A A I A Y G M D K K D G E K N V L V
 721 TTTTCGATCTTGGAGGCGGTACCTTTGATGTCTCTCTGCTCACCATTGACAACGGAGTTT
 219 F D L G G G T F D V S L L T I D N G V F
 781 TGAGGTCGTCTCTACCAACGGAGATACTCCTTGGAGGAGAGGATTTTCGACCAGAGGTT
 239 E V V S T N G D T H L G G E D F D Q R V
 841 CATGGAGCACTTCATCAAGCTGTACAAGAAAAAGAAGGGCAAGGATCTCAGAAAAGACGT
 259 M E H F I K L Y K K K G K D L R K D V
 901 GCGAGCTGTACAGAAGCTAAGACGTGAGGTTGAGAAGGCCAAGAGAGCTCTGTCCGCCGC
 279 R A V Q K L R R E V E K A K R A L S A A
 961 TCACCAGGTTTCGTGTTGAGGTTGAATCCTTGATTGACGGAGAGGATTTCTCCGAGACTCT
 299 H Q V R V E V E S L I D G E D F S E T L
 1021 GACCAGAGCTAAGTTTGAAGAACTCAACATGGACCTGTTCCGTGGAACCTGAAGCCCGT
 319 T R A K F E E L N M D L F R G T L K P V
 1081 CCAGAAGGTTCTAGAAGATGCTGATCTCGGCAAGAAGGATATTGACGAGATTGTTCTTGT
 339 Q K V L E D A D L G K K D I D E I V L V
 1141 TGGAGGTTTCYACYCGYATCCCCAAGATTCAAGGCTCTTGTCAAGGAGTTCTTCAACGGAA
 359 G G S T R I P K I Q A L V K E F N G K
 1201 GGAACCCTCCAGAGGAATCAACCCTGACGAGGCTGTTGCCTATGGAGCTGCTGTCCAGGC
 379 E P S R G I N P D E A V A Y G A A V Q A
 1261 TGGAGTCTCTCTGGAGAACAGGACACTGGAGATCTTGTCTGCTTGGAGCTGAGAACCC
 399 G V L S G E Q D T G D L V L L D V N P L
 1321 GACCCTTGGTATTGAAAACCTGTGCGGAGGAGTTATGACCAAGTTGATCTCCAGGAACACTGT
 419 T L G I E T V G G V M T K L I S R N T V
 1381 TATCCCCACCAAGAAGTCTCAGATTTTCTCCACTGCCGCTGATAATCAAAAACAGTGTCA
 439 I P T T K K S Q I F S T A A D N Q V T
 1441 CATCCAGGTTTTTCGAGGGAGAGCGTCCCATGACCAAGGACAACCATCAGCTTGGTAAATT
 459 I Q V F E G E R P M T K D N H Q L G K F
 1501 TGACCTGACCAACATTCACCCAGCACCCAGAGGAGTTCCCCAGATCGAGGTCACCTTCGA
 479 D L T N I P P A P R G V P Q I E V T F E
 1561 GATTGACGCTAACGGTATCCTCCAGGTGTCTGCCGAGGACAAGGGAAGTGGAAACAAAGGA
 499 I D A N G I L Q V S A E D K G T G N K E
 1621 GAAGATTACCATCACCAACGACCAGAACAGACTCACCCCTGAGGACATCGAGAGGATGAT
 519 K I T I T N D Q N R L T P E D I E R M I
 1681 CAACGATGCTGAGAAGTTTGTGATGAGGACGCTAAGCTCAAGGGACGTGTTGAGGCTAG
 539 N D A E K F A D E D A K L K G R V E A R
 1741 GAACGAACTGGAGAGCTACGCTTACAGTCTTAAGAACCAGATCGCTGACAAGGAGAAGCT
 559 N E L E S Y A Y S L K N Q I A D K E K L
 1801 TGGTGGTAAACTGAGTGATGACGAGAAGGAGAAGATCGAAGAGATCTTGACTGAGAAGAT
 579 G G K L S D D E K E K I E E I L T E K I
 1861 CGCTTGGTTGGAGGAGAACCAGGAGGCTGATGCCGAGGAGCTGAAGGCTCAGAAGAAGGA
 599 A W L E E N Q E A D A E E L K A Q K K E
 1921 GATGGAGGATATTATTCAACCTATTATTGCAAAAACCTGTACCAGGGTACTGGTGAGGCTCC
 619 M E D I I Q P I I A K L Y Q G A G G A P
 1981 CCCCAGGCGGTGAAGAGGAGGGAGGAGGAGGATGAGGACCTCAAGGATGAATTGTAATC
 639 P G G E E E G G E E D E D L K D E L *
 2041 TCATCCCCTCCCTTCCCTCGCCCCTATAAACATTTAATTAATAGCGGGCGGTCACAA
 2101 GGCTGTTAAAAAGTGAGATCACGTGATCAGAGAAATCTGAATTACGGTTTGCAAAAATCCA
 2161 CGAAAGTTTCGTGGAAAAATCCGCGCATTCCGAGCACACTCATGACCTTTAGATCCCATGG
 2221 TCATGGATGAAATGTAACCAATGAATGATGATGAAATGTAATCCATATTTATTATTTGTT
 2281 GATAAGTTTTGTGATATG[AATAAA]TCTTCTGTTAGGTTTT[AATAAA]AAGTTTTAAACTAA
 2341 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

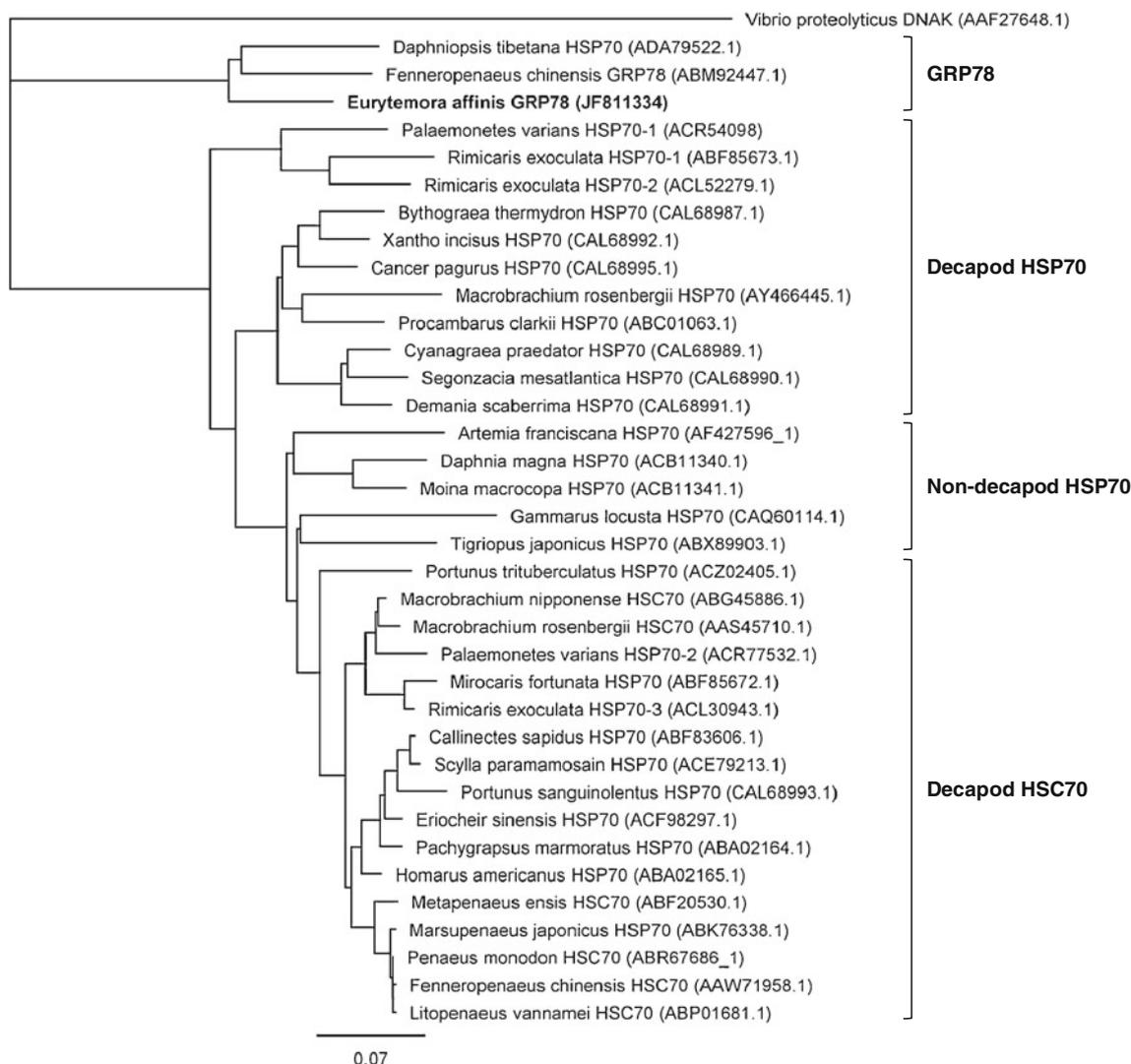


Fig. 3 Phylogenetic tree of HSP70 amino acid sequences of crustaceans. The HSP70 sequences of 35 crustacean species were analysed according to Jukes–Cantor genetic distance model and neighbour-joining method. Tree was rooted using *Vibrio proteolyticus* DNAK as outgroup. The scale bar represents 0.07 substitutions per site. The GenBank accession numbers of the amino acid sequences are provided

after each species name, and the cloned *E. affinis* sequence is identified in *bold*. Four functional groups of the sequences can be highlighted as reticulum endoplasmic forms (identified as *GRP78*), decapod cytosolic inducible forms (identified as *Decapod HSP70*), decapod cytosolic constitutively expressed forms (identified as *Decapod HSC70*) and non-decapod cytosolic forms (identified as *Non-decapod HSP70*)

NP_990822.1), *Danio rerio* (81.62%; NP_998223.1) and *Xenopus tropicalis* (81.55%), the mollusc *Crassostrea gigas* (79.75%; BAD15288.1) and the nematode *Caenorhabditis elegans* (77.78%; AAA28074.1). Conversely, the identity percentage with cytosolic HSP70 amino acid sequences of others crustaceans species only ranged from 60.16 (*Rimicaris exoculata* HSP70-1; ABF95673.1) to 63.32 (*Portunus sanguinolentus* HSP70; CAL68993.1). Consequently, HSP70 sequence characterized in *E. affinis* in this present work has been designed as Ea-GRP78.

Degenerate primer pair DP-*hsp90.F*/DP-*hsp90.R* allowed amplification of a fragment of 364 bp which, after Blast

analysis appeared to correspond to a part of a *hsp90* transcript. The full-length nucleotide sequence obtained from 5'- and 3'-RACE PCR is 2,299 bp with 2,124 bp ORF encoding 707 amino acids (Fig. 4; GenBank accession number, JF811335). The cDNA contains a 5'-UTR of 43 bp and 3'-UTR of 132 bp including a stop codon (TAA), a

Fig. 4 Nucleotide and deduced amino acid sequences of HSP90A from *Eurytemora affinis*. Heat shock protein 90 family signature motifs are highlighted as shaded regions (positions 28–48, 95–103, 119–134, 336–346 and 363–377). The consensus cytosolic signature of cytosolic form is underlined (positions 703–707). The polyadenylation signal site is shown in the open box. The stop codon is indicated by a star

1 GCCATATACTTCACGACAAATCAACTAATACTAACACATAAAGATGTCGGACGAAATTGA
 1 GACCTTCGCCTTTTCAGGCCGAGATTGCACAGCTTATGTCCCTCATTATCAACACATTTTA
 61 T F A F Q A E I A Q L M S L I I N T F Y
 7 CTCCAATAAAGAAATTTTCTCCGAGAGTTGATCTCCAATGCCTCCGATGCTCTGGACAA
 121 S N K E I F L R E L I S N A S D A L D K
 27 AATTAGATATGAATCCCTCACTGATGCCAGCAAGCTGGAGGGACAAAAGGATCTGTACAT
 181 I R Y E S L T D A S K L E G Q K D L Y I
 47 CAAACTCATCCCTGATGTTGACGCCAAGACCCTGACCATCATTGATTCCGGTATCGGTAT
 241 K L I P D V D A K T L T I I D S G I G M
 67 GACCAAGGCCGATATGATCAACAACCTTGGGAACAATTGCAAAAATCTGGAACCAAAAGCTTT
 301 T K A D M I N N L G T I A K S G T K A F
 87 CATGGAGGCTCTTCAGGCCGGAGCTGATATTAGTATGATTGGACAGTTTGGAGTAGGTTT
 361 M E A L Q A G A D I S M I G Q F G V G F
 107 CTACTCGGCCTACCTCGTGCCTGACAAAGTTGTCTCACCTCCAAGCACAACGATGACGA
 421 Y S A Y L V A D K V V V V T S K H N D D E
 127 GCAGTACATCTGGGAGTCCAGCGCTGGAGGATCTTTACAATCAAGACTGACAGCGGTGA
 481 Q Y I W E S S A G G S F T I K T D S G E
 147 GCCCATTGGGCGTGAACCAAGATCGTCTCCACATGAAGGAAGATCAGTGCAGTATAT
 541 P M G R G T K I V L H M K E D Q C E Y I
 167 CGAGGAGAAGAAGATCAAGGAGATCGTAAAGAAGCACTCTCAATTCATTGGATATCCTAT
 601 E E K K I K E I V K K H S Q F I G Y P I
 187 CAAGTCTTGGTCCAGAAGGAGCGTGAGAAGGAGGTTTCCGACGATGAGGCGGAGTTGA
 661 K L L V Q K E R E K E V S D D E A E V E
 207 GGAGCCCAAGGAGGGAGAGGAACCTAAGATTGAGGATGTTGGAGAGGATGCTGATGCTGA
 721 E P K E G E A P K I E D V G E D A D A E
 227 GAAGAGCACGGAGAAGAAGACTAAGAAGATCAAGGAGAAGTATACCGAGGATGAGGAGCT
 781 K S T E K K T K K I K E K Y T E D E E L
 247 GAACAAAACCTAAACCCATCTGGACCAGATCTCCTGATGATATCTCCAACGAGGAGTATGG
 841 N K T K P I W T R S P D D I S N E E Y G
 267 AGAGTCTACAAGTCTCTGACCAACGACTGGGAGGATCATCTCGCCGTCGAAGCACTTCTC
 901 E F Y K S L T N D W E D H L A V K H F S
 287 TGTTGAGGGTCAGCTTGAGTTGAGGCTCTTCTTTCATCCCCAAGCGTACCCCTTCGA
 961 V E G Q L E F R A L L F I P K R A C P F D
 307 TCTGTTGAGAACAAAGAAGTCCAAGAACAAACATCAAGCTCTATGTTCTGCTGTTTTTCAT
 1021 L F E N K K S K N N I K L Y V R R V F I
 327 CATGGATAACTGCGAGGACATCATCCCTGAGTATCTCAACTTTGTCCGTGGAGTTGTTGA
 1081 M D N C E D I I P E Y L N F V R G V V D
 347 CTCTGAAGATCTTCCCCTCAACATCTCCAGAGAGATGCTCCAGCAGAACAAGATCCTCAA
 1141 S E D L P L N I S R E M L Q Q N K I L K
 367 GGTTATCAGGAAGAACATCGTCAAGAAGTTCATGGATGTATCGAGGAGATCTCGAGGA
 1201 V I R K N I V K K V M D V I E E I S E D
 387 TAAGGATAATTACAAAAAGTTCTACGAGCAGTTTTGGAAAAGAACATCAAGCTCGGAATCCA
 1261 K D N Y K K F Y E Q F G K N I K L G I H
 407 CGAGGACTCTACCAACAGGAAGAAGCTGGCATCTCAGGTTTTACACCTCTGCCTC
 1321 E D S T N R K K L A G H L R F Y T S A S
 427 CGGAGACGAGATGTGCTCTCTCGGAGATTATGTCTCCAGGATGAAGGAGACTCAAAAGGA
 1381 G D E M C S L G D Y V S R M K E T Q K D
 447 TGTTTACTATATCACCAGGAGAATCCAAGGAGTTGTTGCAACCTCATCTCTGTTGAGAG
 1441 V Y Y I T G E S K E V V A T S S F V E R
 467 ACTGAAGAAGCGTGGACTCGAGGTCGTTTACATGACTGAACCTATTGATGAATATGTTGT
 1501 L K K R G L E V V Y M T E P I D E Y V V
 487 CCAGCAGCTGAAGGALTTCGAGCGGAAAGAAMCTCGTCTCCGTCACTAAGGAGGTTTGA
 1561 Q Q L K E F D G K N L V S V T K E G L E
 507 GCTCCCCGAGGATGAGGAGGAGAAGAAGCGTGAGGAGGATGTTAAGAAGTTTCGAGCC
 1621 L P E D E E K K R E E D V K K F E P
 527 CCTCTGCAAGGTGATGAAGGATATCCTGGACAAGAAAGTTGAGAAGGTTGTGTCTCCAG
 1681 L C K V M K D I L D K K V E K V V V S S
 547 CCGTCTCGTCTCATCCCCCTGCTGCATTGTTACATCTCAGTATGGTTGGACCGCTAACAT
 1741 R L V S S P C C I V T S Q Y G W T A N M
 567 GGAGAGGATCATGAAGGCTCAGGCTCTCAGAGACACTCTACCATGGGATACATGGCTGC
 1801 E R I M K A Q A L R D T S T M G Y M A A
 587 CAAGAAGCATCTGGAGATCAACCCGACCCTCCATCGTCGAGAACCTCAGAGTCAAGGC
 1861 K K H L E I N P D H S I V E N L R V R A
 607 TGAAGCTGACAAGAACGACAAGTCTGTAAAGGATCTTGTGATGCTCCTGTTTCGAGACCTC
 1921 E A D K N D K S V K D L V M L L F E T S
 627 TCTCCTCAGCTCCGGGTTTCAGCCTGGAGGATCCTATGGTTACAGCCATGAGAATTCACAG
 1981 L L S S G G F S L E D P M V H A M R I H R
 647 GATGATCAAGCTTGGTCTGGGTATTGATGAGGAGGATAACGAGGCTGAGGCTGCTGCTGA
 2041 M I K L G L G I D E E D N E A E A A A D
 667 TGATATGGATATGCCTCCTCTAGAGGAGATGCTGAGGATGCCAGCAGAATGGAGGAGGT
 2101 D M D M P P L E G D A E D A S R M E E V
 687 CGATTAACCTCTTTGATCAAAGCGCAATTAATTTTAAACCAAAATGCATTGTACCGAAAAATT
 2161 D *
 707 CACTCAGTTTTTATTTCTTTATGTTCAATAAACTCTTTGTAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 2221 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 2281

polyadenylation signal and a poly(A) tail. Predicted protein presents a calculated molecular mass of 80.77 kDa and a predicted isoelectric point of 4.94. No signal peptide was detected with the Signal P software. The deduced amino acid sequence displays all five conserved amino acid blocks distinctive of the HSP90 protein family described by Gupta et al. (1995): NKEIFLRELISN-[SA]-SDALDKIR (residues 28–48), LGTIA-[KR]-SGT (residues 95–103), IGQFGVGFYSA-[YF]-LVA-[ED] (residues 119–134), IKLYVRRVFI (residues 336–346) and GVVDS-[ED]-DLPLN-[IV]-SRE (residues 363–377; Fig. 4). Motif scan analysis showed that the amino acid sequence is divided into the ATP binding domain (residues 28–181; *Pfam ID HAT-Pase_c PF02518*) and the functional domain of HSP90 (residues 184–707; *Pfam ID HSP90 PF00183*). The C-terminal consensus cytosolic motif, MEEVD, appeared at position 703–707. The alignment from multiple sources of cytosolic HSP90 underlined a high conservation degree within crustaceans, with identities ranging from 77.23% (*Exopalaemon carinicauda*; ADM88040.1) to 84.10% (*T. japonicus*; ACA03524.1), and over a wide range of

organisms such as the mollusc *M. galloprovincialis* (80.28%; CAJ85741.1), the insect *D. melanogaster* (79.92%; NP_523899.1), or the vertebrates *Xenopus laevis* (79.33%; NP_001086624.1), *M. musculus* (78.85%; NP_034610.1), *G. gallus* (78.60%; NP_001103255.1) and *D. rerio* (77.68%; Q90474.3). Consequently, HSP90 sequence characterized in *E. affinis* in the present study was referred as a cytosolic HSP90 form, and designed as Ea-HSP90A. The phylogenetic tree (Fig. 5) showed that the HSP90 sequences of copepod including Ea-HSP90A were distinct from HSP90 sequences of decapods. Within decapods, two groups could be differentiated: a first group including *Portunus trituberculatus* HSP90-form 1 (ACQ90225.1) and a second group including *P. trituberculatus* HSP90-form 2 (ACQ90226.1).

Effects of temperature and salinity on the gene expression profiles in controlled laboratory conditions

Expression profiles of *Ea-grp78* and *Ea-hsp90A* obtained after different temperature and salinity treatments are shown in Figs. 6 and 7. Basically, the transcript level measured in

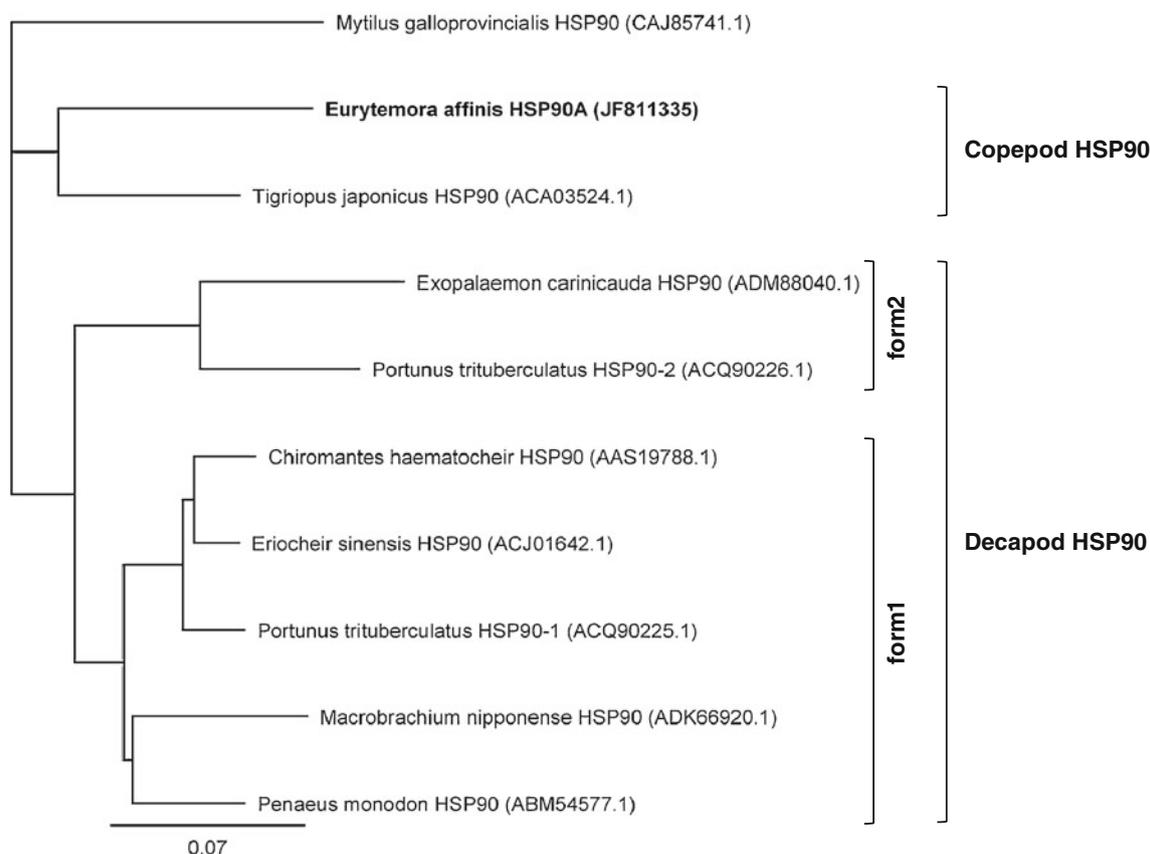
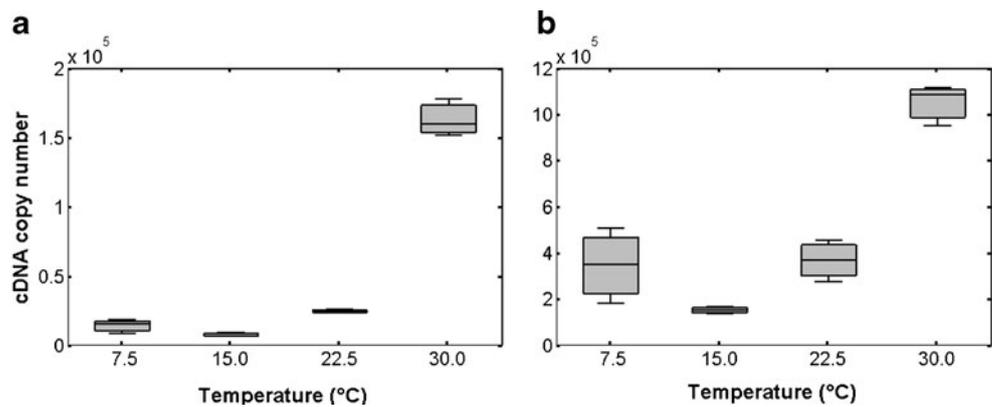


Fig. 5 Phylogenetic tree of HSP90 amino acid sequences of crustaceans. The HSP90 sequences of 8 crustacean species were analysed according to Jukes–Cantor genetic distance model and neighbour-joining method. Tree was rooted using *Mytilus galloprovincialis* HSP90 as outgroup. The scale bar represents 0.07 substitutions per

site. The GenBank accession numbers of the amino acid sequences is provided after each species name, and the cloned *E. affinis* sequence is identified in *bold*. Two sequence groups can be defined as copepod HSP90 and decapod HSP90

Fig. 6 Levels of *Ea-hsp90A* (a) and *Ea-grp78* (b) transcripts measured in pools of adult *Eurytemora affinis* after a 90-min thermic shock. The 15°C group corresponds to control condition. Boxes extend from the lower to the upper quartile with an internal segment for the median ($n=3$); the whiskers extend to the most extreme data points



controls (i.e. copepods kept in optimum rearing conditions: 15°C and salinity of 15) was in mean ($n=9$) of $156,537 \pm 17,163$ cDNA copies for *Ea-grp78* and $6,358 \pm 810$ cDNA copies for *Ea-hsp90A*. Although the different experiments (from exposure to transcript quantification) were performed independently, the inter-experiment variation coefficients calculated from mean expression values of each control were 4% and 20% for *Ea-grp78* and *Ea-hsp90A* genes, respectively. These results attest the reproducibility of the RT-qPCR procedure used in this study.

Significant up-regulations were observed in copepods exposed to thermic shocks during 90 min, for both *Ea-hsp90A* and *Ea-grp78* transcripts (Fig. 6). The quantity of *Ea-hsp90A* transcripts reached 1.7-, 3.0- and 19.7-fold inductions in organisms shocked at temperatures of 7.5°C, 22.5°C and 30°C, respectively, in comparison to control ($p < 0.05$; Fig. 6a). To a lesser extent, the *Ea-grp78* gene expression was significantly 2.3-, 2.4- and 6.9-fold more expressed, respectively, in comparison with the control ($p < 0.05$; Fig. 6b).

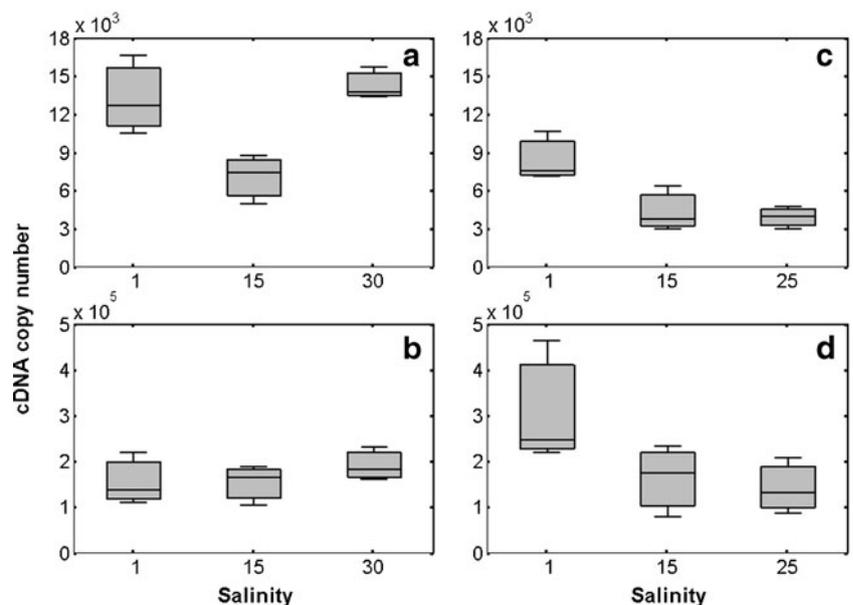
On one hand, hypo- and hyper-osmotic shocks (i.e. salinities of 1 and 30) during 90 min caused a 2-fold induction

of *Ea-hsp90A* gene expression in comparison to controls (Unilateral Mann–Whitney rank sum test; p values < 0.05 ; Fig. 7a), whereas no significant change was measured for *Ea-grp78* (Fig. 7b). On the other hand, similar expression profiles were observed for the two transcripts after 72 h of exposition to salinities of 1 and 25 (Fig. 7c, d). A significant 2-fold induction was observed in copepods kept at salinity of 1 ($p < 0.05$), whereas no change of transcription level was recorded at the salinity of 25, in comparison to controls.

Spatial and temporal variability of the gene expression profiles in Seine Estuary population

All samples were analysed at the same time (from total RNA extraction to transcript quantification). Data are presented in Table 1. Significant changes of *Ea-grp78* and *Ea-hsp90A* gene expression were observed throughout the different sampling (Kruskal–Wallis rank sum tests: $H(7, N=40) = 30.4, p = 0.0001$). The lowest levels were observed during the sampling campaign of April 2009 for a salinity of 4.2 and a water temperature of $14.7 \pm 0.9^\circ\text{C}$: $6,523 \pm 1,881$ and

Fig. 7 Levels of *Ea-hsp90A* (a, c) and *Ea-grp78* (b, d) transcripts measured in pools of adult *Eurytemora affinis* after a 90-min osmotic shock (a, b) or a 72-h period of exposition to different salinities (c, d). The salinity 15 group corresponds to control condition. Boxes extend from the lower to the upper quartile with an internal segment for the median ($n=3$); the whiskers extend to the most extreme data points



243,995±76,075 cDNA copies for *Ea-hsp90A* and *Ea-grp78* representing 1- and 1.6-fold the mean level of copepods kept in optimum laboratory rearing conditions, respectively (see the “Effects of temperature and salinity on the gene expression profiles in controlled laboratory conditions” section). The transcription levels recorded at the others salinities (10, 15 and 20) during this sampling campaign did not exceed 2.5-fold the mean levels previously observed in laboratory controls. Conversely, strong increases of *Ea-grp78* and *Ea-hsp90A* gene expression were observed during sampling campaigns of June 2009 and May 2010, for respective water temperatures of 20.0°C and 16.3±0.4°C. In May 2010, the quantity of transcripts tended to increase gradually inversely to salinity. The highest expression levels observed for a salinity of 4.8 were 10- and 6-fold the mean level of laboratory control for *Ea-hsp90A* and *Ea-grp78*, respectively. In the same way, the expression levels of copepods sampled in June 2009, at a salinity of 0.5, were 6- and 8-fold the mean level of laboratory control for *Ea-hsp90A* and *Ea-grp78*, respectively.

Discussion

Characterization of *E. affinis* GRP78 and HSP90A sequences

In the present study, we characterized the full-length cDNA of the *grp78* gene from the calanoid copepod *E. affinis*, designed as *Ea-grp78*. To our knowledge, this is the first report concerning a *grp78* cDNA sequence cloned from Copepoda. More generally, cDNA sequences of *grp78* have been cloned from only two other crustacean species, the water fleas *D. tibetana* (FJ907314) and the Chinese shrimp *F. chinensis* (EF032651). The deduced amino acid sequence, Ea-GRP78, contained the three conserved HSP70 family signatures. All homologs of HSP70 proteins display an N-terminal ATPase domain, which is essential for active chaperone-mediated folding (Bukau and Horwich 1998). Ea-GRP78 displayed a motif very close to ATP/GTP-binding site motif A ([AG]-x(4)-GK-[ST]), AEAYLGKK (residues 153–161). This ATP/GTP-binding site motif was also found in GRP78 sequences from *D. tibetana* (AEAYLGKK, residues 158–166) and *F. chinensis* (AEAYLGKP, residues 156–163; Luan et al. 2009), as well as in cytosolic HSP70 sequences of other crustacean species such as the prawn *Macrobrachium rosenbergii* (AEAFGLGST at position 131–138 for Mar-HSC70 and AEAYLGKT at position 71–78 for Mar-HSP70; Liu et al. 2004) and the shrimps *Microcaris fortunanta* and *R. exoculata* (AEAFGLGGT at position 131–138, and AESYLGKK at position 84–91, respectively; Ravaux et al. 2007). The signal peptide at the N terminus and the consensus tetrapeptide KDEL at the C terminus of the amino acid sequence, ensure the protein targeting to the ER.

Membership of the sequence presently characterized to GRP78 protein group was confirmed by its high identity with GRP78 of a wide range of organisms (from nematodes to mammals), in comparison to the low identity that it shares with cytosolic HSP70 forms of other crustacean species. The phylogenetic tree of known HSP70 sequence within crustaceans clearly illustrates the distinction between the group of GRP78 and the group of cytosolic HSP70. This last group is by far the most represented since it regroups more than 90% of HSP70 sequences characterized in crustaceans. As previously reported by Cottin et al. (2010), the sequences of inducible and constitutive cytosolic forms from decapod crustaceans appeared in separate groups in the phylogenetic tree. The classification given by the tree is in accordance with the results of functional studies performed in some species such as *Palaemonetes varians* and *R. exoculata* (Cottin et al. 2010) and *M. rosenbergii* (Liu et al. 2004). However, this classification between inducible and constitutive cytosolic forms highlights a gap of sequence annotation since among 17 sequences corresponding to the constitutive cytosolic form, only 6 are clearly identified as HSC70. The classification of cytosolic forms in non-decapod crustacean species is more difficult to discuss, because only one sequence is available for each species, and more generally much lesser works have been performed in these organisms in spite of their eco-physiological interest as well their key role in aquatic ecosystems.

We also characterized the complete cDNA sequence of a cytosolic *hsp90* gene from *E. affinis*, designed *Ea-hsp90A* (GenBank accession numbers: JF811335), in reference to the nomenclature system that was proposed by Chen et al. (2005a). The Ea-HSP90A deduced amino acid sequence contained the five conserved HSP90 family signatures (Gupta 1995), and an ATP-binding domain, essential for basic functions of HSP90 (Prodomou et al. 1997). In addition, the consensus motif MEEVD at the C terminus suggested that Ea-HSP90A belongs to the cytosolic HSP90 family (Gupta 1995). In accordance, Ea-HSP90A displayed high homologies with cytosolic HSP90 sequences from a wide range of organisms including invertebrates and higher vertebrates. In crustaceans, only 8 HSP90 sequences are available on the GeneBank database, 7 of which have been cloned from decapod species. Only one HSP90 sequence was known in copepods, which belongs to *T. japonicus* (ACA03524.1). As expected, Ea-HSP90 displayed the maximum identity with HSP90 of *T. japonicus* (84%). In invertebrates, it has been considered that a unique cytoplasmic HSP90 exists, which can be encoded by a single or two genes (Pantartzzi et al. 2009). However, Zhang et al. (2009) isolated two *hsp90* mRNA (identified as *hsp90*-form 1 and *hsp90*-form 2) with distinct expression patterns, which encoded two distinct HSP90s, in marine crab *Portunus trituberculatus*. The phylogenetic analysis, performed in this

study, indicates that the divergence between the two forms of cytosolic HSP90 occurred among decapod evolution. Indeed, HSP90 sequences of copepods are distinct from HSP90 sequences of decapods, which subdivided into a group including *P. trituberculatus* HSP90-form 1 and another group including *P. trituberculatus* HSP90-form 2. Nevertheless, this conclusion is speculative and further works should be conducted on non-decapod species to confirm this hypothesis.

Expression patterns of *grp78* and *hsp90* in *E. affinis*: laboratory and field studies

The RT-real time PCR procedure was successfully adapted to *E. affinis*. Although normalization of target gene expression against expression of endogenous genes considered as invariant (“housekeeping genes” or “reference genes”) is certainly the most used method in RT-pPCR, we opted, in this study, for a standardized method of absolute quantification. Indeed, as underlined by Bustin et al. (2009) no universal reference gene exists and normalizing to a regulated reference gene will distort data leading to wrong conclusions. So stability of a reference gene should be validated for both particular tissues or cell types, and experimental designs. In optimal condition, normalization may be improved by using the geometric average of multiple validated reference genes. However, in the context of the present study, validation of reference genes has been very tedious since our knowledge of transcriptome is limited in lot of invertebrate species studied in ecological physiology such as copepods. Besides, the validation of candidate genes as reference in perspective of in situ application could be very difficult, if we consider the diversity and the variability of environmental factors, which possibly influence their transcription levels. The results showed that the methodology used in this study is precise and robust. Indeed, although the different laboratory experiments were performed independently (from exposure to transcript quantification), the quantification of *Ea-grp78* and *Ea-hsp90A* transcripts measured from controls exhibited a low inter-experimental variability.

Compared with the progress made in the functional study of HSP70 cytosolic isoforms, few studies focused on GRP78 or HSP90 in crustaceans. In this paper, the expression patterns of *Ea-grp78* and *Ea-hsp90A* were analysed from copepods subjected to different controlled stresses in laboratory in order to validate their functionality and assess the potential effects of two important environmental factors of estuarine ecosystem, temperature and salinity. Transcript levels of both genes was significantly induced by thermal heat and cold shocks during 90 min. *Ea-hsp90A* inductions of 2- and 3-fold were observed after the shocks at 7.5°C and 22.5°C, whereas treatment at 30°C resulted in a radical 20-

fold increase. In a lesser extent, *Ea-grp78* was from 2- to 7-fold more expressed in treated copepods. In laboratory as well as field conditions, the density of *E. affinis* drops during summer temperature (~20°C) compared to the optimal spring temperature of 15°C (Devreker et al. 2010). In parallel, a very low fecundity of females, coupled with a decrease of potential for recruitment were observed within the Seine Estuary population during a long negative anomaly of late winter temperature observed during 2005 when the lowest values of temperatures dropped to 5°C (Devreker et al. 2010). That tends to show that the low inductions of *hsp* genes recorded during our experiment (at 7.5°C and 22.5°C) transcribe a thermic stress sufficient to affect life history traits. This observation is in accordance with previous laboratory studies which have shown that very small amounts of temperature induced HSP can have effects on organism life traits (Sørensen et al. 2003). It could be interesting to continue the study of links between *hsp* gene inductions and life trait alterations in *E. affinis* to precise interpretation of this molecular tool in perspective of physiological ecology applications. Similar gene expression patterns were reported in hepatopancreas and gills of the crab *P. trituberculatus* for the two HSP90 isoforms (HSP90-form 1 and HSP90-form 2; Zhang et al. 2009). The authors observed more important inductions in heat-shocked (30°C) organisms in comparison to cold-shocked (10°C) ones. The expression pattern of *P. trituberculatus hsp90* from 2 genes, which displays the highest induction levels, is the closest to one described in this study for *Ea-hsp90*. In the same way, Li et al. (2009) reported important inductions (until 12-fold the expression level of control) in the Chinese shrimp *F. chinensis*. Conversely, in spite of the phylogenetic nearby with *E. affinis*, very light fluctuations of *hsp90* transcripts were observed in copepod *T. japonicus* shocked at 35°C (Rhee et al. 2009). Some works have shown that HSP90 can be also induced by heat shock in other aquatic invertebrates such as the molluscs *Haliothis tuberculata* (Farcy et al. 2007), *Laternula elliptica* (Kim et al. 2009) and *Haliothis discus* (Wang et al. 2011). To our knowledge, only Luan et al. (2009) have previously performed functional study of GRP78 in another crustacean species. In line with our results, these authors showed that expression of *grp78* was up-regulated (up to 2.4-fold) by heat shock in the Chinese shrimp *F. chinensis*. Concerning the effects of salinity, *Ea-hsp90* and *Ea-grp78* expression were assessed after short- (90 min) and long-term (72 h) exposures to hypo- (salinity of 1) and hyper-osmotic stresses (salinity of 25–30) in comparison with control condition (salinity of 15). The two genes showed different responses after osmotic-shock treatments. Indeed, after a 90-min exposure, no modification of *Ea-grp78* transcript level was recorded whereas the both hypo- and hyper-osmotic stresses significantly induced a 2-fold increase of the *Ea-hsp90A* transcript quantity. Inversely,

similar patterns were observed for *Ea-hsp90A* and *Ea-grp78* after long-term exposure. A significant 2-fold increase of transcript levels was observed in copepods kept at the salinity of 1, but no fluctuation was recorded at the salinity of 25. Impairment of development and survival of early life stage (i.e. nauplii larval stages) have been previously observed in *E. affinis* long-term exposed at the salinity of 1 (Devreker et al. 2004). This would agree the stress transcribed by the *hsp* gene inductions recorded in the same conditions. Nevertheless, the authors equally showed that the long-term exposure to high salinity (25) induced more important and significant effects on a large range of life history traits (e.g. reproduction and survival of adult stage; Devreker et al. 2007, 2009), whereas no induction of *hsp* genes was observed in our study excepted for *Ea-hsp90A* at short-term exposure. So, in opposition to previous discussion about thermic stress, the link between physiological response and the effects on the life traits is unclear in the case of osmotic stress. This gap highlights the need to obtain more detailed understanding of eco-physiological role of HSPs. Our results corroborate the works of Spees et al. (2002) that report significant expression induction of cytosolic HSP90s in the lobster *Homarus americanus* after both hypo- and hyper-osmotic shocks. The authors observed an *hsp90* induction up to 600% and 300% of control transcript level, at low and high salinities. The greater response observed in lobster compared to *E. affinis* might result in part of the poor osmoregulative capacities of this stenohaline species. Oppositely, Zhang et al. (2009) have shown that *hsp90*-form 1 and *hsp90*-form 2 were down-regulated in the hepatopancreas, muscle and ovary of *P. trituberculatus* exposed short-term to low or high salinity. These authors suggested that the osmotic stresses may exceed the tolerance of these tissues and turn lead to the cell death. Some works have shown that *hsp90* can also be induced by osmotic shock in other aquatic organisms such as the Atlantic salmon, *Salmo salar* (Pan et al. 2000), or the oyster, *Crassostrea hongkongensis* (Fu et al. 2011). By contrast, to our knowledge, no study has reported the effect of osmotic stress on the GRP78 synthesis level.

Most of the published works report the effects of an acute or repetitive stress on the physiology of organisms exposed in laboratory. Although such approaches are necessary to provide specific biological response to a given stress in controlled conditions, they are less representative than fieldworks since they do not allow adequately assessing the combination of biotic and abiotic factors found in natural conditions (Lejeusne et al. 2006). Nevertheless, long-term in situ applications within natural populations are still relatively scarce (e.g. Hofmann and Somero 1995; Lejeusne et al. 2006; Minier et al. 2000). In the present study, the expression of *Ea-grp78* and *Ea-hsp90A* genes was measured from copepods directly sampled into the natural population of the

Seine Estuary along of the salinity gradient, on the occasion of three test campaigns. For that, organisms of adult stage—males and females in sexual rest—were rigorously selected in order to minimize the potential influence of seasonal population structure variations. On one hand, the levels of *hsp* gene expression recorded in April 2009 for water temperature of 15°C, stayed relatively constant for salinities ranged from 5 to 20, and were closed to ones measured in copepods kept in optimal laboratory conditions. These results mean that the copepods sampled at this date did not seem to display physiological stress. That is in accordance with some previous works, which showed that the spring is the most favourable period for *E. affinis* population dynamic in Seine Estuary (Mouny and Dauvin 2002). Indeed, these authors recorded maximal density values for this period when temperatures are ranged from 10°C to 15°C. These temperatures equally correspond to the best recruitment success observed during laboratory study (Devreker et al. 2007, 2009). On the other hand, we observed strong inductions of *hsp* gene expression (up to 10- and 6-fold the mean level of laboratory control for *Ea-hsp90A* and *Ea-grp78*) in copepods sampled at low salinity during the campaign of June 2009 and May 2010, when water temperature of Seine Estuary increases. These results tend to show that the low salinity and the increase of temperature seem to have a synergic effect on stress condition of copepods. However, other potential biotic or abiotic factors (e.g. pH, dissolved O₂ or pollution) not considered in the present study could also greatly influence the expression levels of the two HSPs studied (Lejeusne et al. 2006). In any case, the results obtained during this preliminary fieldwork underline the interest to estimate and quantify the role of HSPs in the ecology of *E. affinis* during long-term monitoring of natural populations. Therefore, in actual context of environmental changes including global warming, pollution and habitat fragmentation, the development and validation of relevant stress indicators is fundamental to improve the detection and the interpretation of biological consequences on organisms and populations (Sørensen et al. 2003).

Acknowledgements This study is a contribution to ZOOSEINE project funded by Seine-Aval IV program within the framework of the project aiming at building bioindicators based on the estuarine copepod *Eurytemora affinis*.

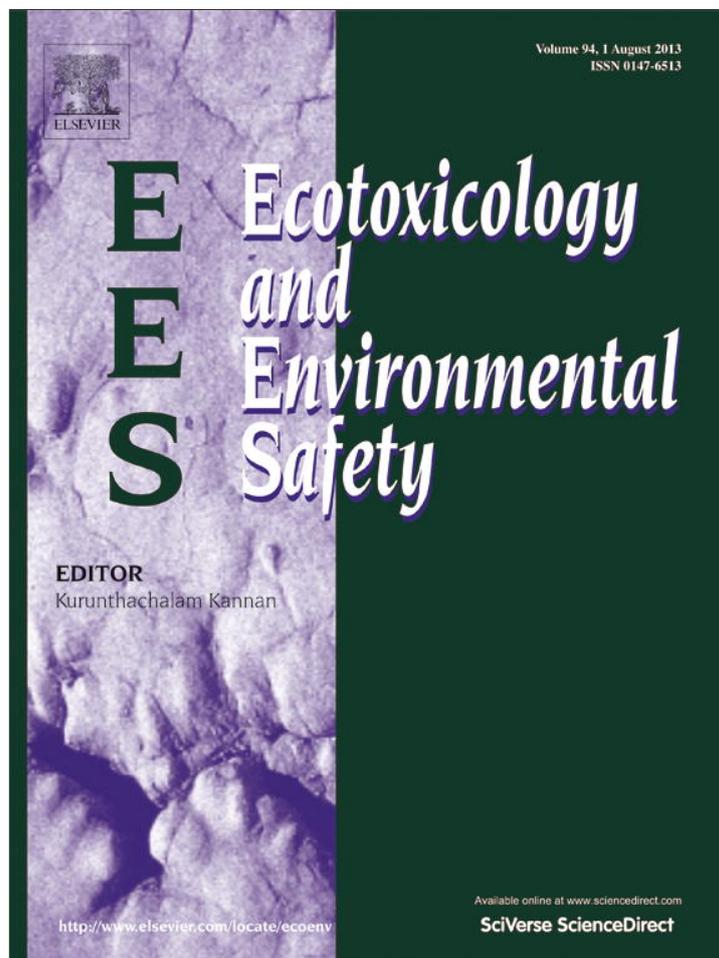
References

- Beyrend-Dur D, Souissi S, Devreker D, Winkler G, Hwang J-S (2009) Life cycle traits of two transatlantic populations of *Eurytemora affinis* (Copepoda: Calanoida): salinity effects. *J Plankton Res* 31 (7):713–128
- Bukau B, Horwich AL (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92(3):351–366

- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55(4):611–622
- Chen B, Piel WH, Gui L, Bruford E, Monteiro A (2005a) The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics* 86(6):627–637
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ (2005b) Real-time quantification of micro-RNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33(20):e179
- Cottin D, Shillito B, Chertemps T, Thatje S, Léger N, Ravaux J (2010) Comparison of heat-shock responses between the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* and the related coastal shrimp *Palaemonetes varians*. *J Exp Mar Biol Ecol* 393(1–2):9–16
- Dauvin JC, Desroy N (2005) The food web in the lower part of the Seine estuary: a synthesis of existing knowledge. *Hydrobiologia* 540(1–3):13–27
- Devreker D, Souissi S, Seuront L (2004) Development and mortality of the first naupliar stages of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) under different conditions of salinity and temperature. *J Exp Mar Biol Ecol* 303(1):31–46
- Devreker D, Souissi S, Forget-Leray J, Leboulenger F (2007) Effects of salinity and temperature on the post-embryonic development of *Eurytemora affinis* (Copepoda; Calanoida) from the Seine estuary: a laboratory study. *J Plankton Res* 29(suppl 1):i117–i133
- Devreker D, Souissi S, Molinero J-C, Nkibuto F (2008) Trade-offs of the copepod *Eurytemora affinis* in mega-tidal estuaries. Insights from high frequency sampling in the Seine Estuary. *J Plankton Res* 30(12):1329–1342
- Devreker D, Souissi S, Winkler G, Forget-Leray J, Leboulenger F (2009) Effects of salinity, temperature and individual variability on the reproduction of *Eurytemora affinis* (Copepoda; Calanoida) from the Seine estuary: a laboratory study. *J Exp Mar Biol Ecol* 368(2):113–123
- Devreker D, Souissi S, Molinero J-C, Beyrend-Dur D, Gomez F, Forget-Leray J (2010) Tidal and annual variability of the population structure of *Eurytemora affinis* in the middle part of the Seine Estuary during 2005. *Estuar Coast Shelf Sci* 89(4):245–255
- Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J, Kearse M, Markowitz S, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson A (2011) Geneious v5.4, available from <http://www.geneious.com/>
- Farcy E, Serpentine A, Fiévet B, Lebel J-M (2007) Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: transcriptional induction in response to thermal stress in hemocyte primary culture. *Comp Biochem Physiol B-Biochem Molec Biol* 146(4):540–550
- Fu D, Chen J, Zhang Y, Yu Z (2011) Cloning and expression of a heat shock protein (HSP) 90 gene in the haemocytes of *Crassostrea hongkongensis* under osmotic stress and bacterial challenge. *Fish Shellfish Immun.* doi:10.1016/j.fsi.2011.04.011
- Gonzalez CRM, Bradley BP (1994) Salinity stress proteins in *Eurytemora affinis*. *Hydrobiologia* 292–293(1):461–468
- Gupta RS (1995) Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants and fungi species. *Mol Biol Evol* 12(6):1063–1073
- Hakimzadeh R, Bradley BP (1990) The heat shock response in the copepod *Eurytemora affinis* (POPPE). *J Therm Biol* 15(1):67–77
- Hofmann GE (2005) Patterns of Hsp gene expression in ectothermic marine organisms on small to large biogeographic scales. *Integr Comp Biol* 45(2):247–255
- Hofmann GE, Somero GN (1995) Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *J Exp Biol* 198:1509–1518
- Karlin S, Brocchieri L (1998) Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. *J Mol Evol* 47(5):565–577
- Kim M, Ahn I-Y, Kim H, Cheon J, Park H (2009) Molecular characterization and induction of heat shock protein 90 in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Cell Stress Chaperon* 14(4):363–370
- Kimmel DG, Bradley BP (2001) Specific protein responses in the calanoid copepod *Eurytemora affinis* (Poppe, 1880) to salinity and temperature variation. *J Exp Mar Biol Ecol* 266(2):135–149
- Kimmel DG, Miller WD, Roman MR (2006) Regional scale climate forcing of mesozooplankton dynamics in Chesapeake Bay. *Estuar Coasts* 29(3):375–387
- Laprise R, Dodson J-J (1994) Environmental variability as a factor controlling spatial patterns in distribution and species diversity of zooplankton in the St. Lawrence Estuary. *Mar Ecol Prog Ser* 107(1–2):67–81
- Lee CE (1999) Rapid and repeated invasions of fresh water by the copepod *Eurytemora affinis*. *Evolution* 53(5):1423–1434
- Lee AS (2001) The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 26(8):504–510
- Lee CE, Peterson CH (2003) Effects of developmental acclimation on adult salinity tolerance in the freshwater-invading copepod *Eurytemora affinis*. *Physiol Biochem Zool* 76(3):296–301
- Lejeune C, Pérez T, Sarrazin V, Chevallon P (2006) Baseline expression of heat-shock proteins (HSPs) of a “thermotolerant” Mediterranean marine species largely influenced by natural temperature fluctuations. *Can J Fish Aquat Sci* 63(9):2028–2037
- Li F, Luan W, Zhang C, Zhang J, Wang B, Xie Y, Li S, Xiang J (2009) Cloning of cytoplasmic heat shock protein 90 (FcHSP90) from *Fenneropenaeus chinensis* and its expression response to heat shock and hypoxia. *Cell Stress Chaperon* 14(2):161–172
- Lindquist S (1986) The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 55:1151–1191
- Liu J, Yang W-J, Zhu X-J, Karouna-Renier NK, Rao RK (2004) Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Cell Stress Chaperon* 9(3):313–323
- Luan W, Li F, Zhang J, Wang B, Xiang J (2009) Cloning and expression of glucose regulated protein 78 (GRP78) in *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol Biol Rep* 36(2):289–298
- Luan W, Li F, Zhang J, Wen R, Li Y, Xiang J (2010) Identification of a novel inducible cytosolic Hsp70 gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and comparison of its expression with the cognate Hsc70 under different stresses. *Cell Stress Chaperon* 15(1):83–93
- Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62(6):670–684
- Minier C, Borghi V, Moore MN, Porte C (2000) Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 50(3):167–176
- Mouneyrac C, Roméo M (2011) Stress proteins and the acquisition of tolerance. In: Amiard-Triquet C, Rainbow PS, Roméo M (eds) *Tolerance to environmental contaminants*. Taylor & Francis Group, London, pp 209–228
- Mouny P, Dauvin JC (2002) Environmental control of mesozooplankton community structure in the Seine estuary (English Channel). *Oceanol Acta* 25(1):13–22
- Nadam J, Navarro F, Sanchez P, Moulin C, Georges B, Laglaine A, Pequignot J-M, Morales A, Ryvlin P, Bezin L (2007) Neuroprotective effects of erythropoietin in the rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiol Dis* 25(2):412–416
- Pan F, Zarate JM, Tremblay GC, Bradley TM (2000) Cloning and characterization of Salmon hsp90 cDNA: upregulation by thermal and hyperosmotic stress. *J Exp Zool* 287(3):199–212

- Pantartzis CN, Kourtidis A, Drosopoulou E, Yiangou M, Scouras ZG (2009) Isolation and characterization of two cytoplasmic hsp90s from *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia) that contain a complex promoter with a p53 binding site. *Gene* 431(1–2):47–54
- Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Labdury JE, Piper PW, Pearl LH (1997) Identification and structural characterisation of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* 90(1):65–75
- Ravaux J, Toullec J-Y, Léger N, Lopez P, Gaill F, Shillito B (2007) First hsp70 from two hydrothermal vent shrimps, *Mirocaris fortunata* and *Rimicaris exoculata*: characterization and sequence analysis. *Gene* 386(1–2):162–172
- Rhee J-S, Raisuddin S, Lee K-W, Seo JS, Ki J-S, Kim I-C, Park HP, Lee J-S (2009) Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* to environmental toxicants. *Comp Biochem Phys C* 149(1):104–112
- Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V (2003) The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol Lett* 6(11):1025–1037
- Spees JL, Chang SA, Snyder MJ, Chang ES (2002) Osmotic induction of stress-responsive gene expression in the Lobster *Homarus americanus*. *Biol Bull* 203:331–337
- Wang N, Whang I, Lee J-S, Lee J (2011) Molecular characterization and expression analysis of a heat shock protein 90 gene from disk abalone (*Haliotis discus*). *Mol Biol Rep* 38(5):3055–3060
- Wong ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39(1):75–85
- Xuereb B, Bezin L, Chaumot A, Budzinski H, Augagneur S, Tutundjian R, Garric J, Geffard O (2011) Vitellogenin-like gene expression in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization in females and potential for use as endocrine disruption biomarker in males. *Ecotoxicol* 20(6):1286–1299
- Zhang X-Y, Zhang M-Z, Zheng C-J, Liu J, Hu H-J (2009) Identification of two hsp90 genes from the marine crab, *Portunus trituberculatus* and their specific expression profiles under different environmental conditions. *Comp Biochem Phys C* 150:465–473

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

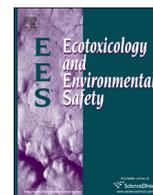
<http://www.elsevier.com/authorsrights>



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv

Highlighted Article

Development of a larval bioassay using the calanoid copepod, *Eurytemora affinis* to assess the toxicity of sediment-bound pollutants

Teddy Lesueur^a, Céline Boulangé-Lecomte^a, Benoît Xuereb^a, Hélène Budzinski^b, Jérôme Cachot^b, Ludovic Vicquelin^{a,b}, Nathalie Giusti-Petrucciani^a, Sabine Marie^a, Fabienne Petit^c, Joëlle Forget-Leray^{a,*}

^a Normandie University, ULH, LEMA EA 3222, F-76600 Le Havre, France

^b Bordeaux University, EPOC-UMR CNRS 5805 LPTC, F-33405 Talence, France

^c Normandie University, UR, UMR CNRS 6143 M2C, FED 4116, F-76821 Mont Saint Aignan, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 April 2013

Received in revised form

24 April 2013

Accepted 26 April 2013

Available online 2 June 2013

Keywords:

Copepod

Estuary

Copepod early life stage

Hydrophobic pollutants

Spiked sediment elutriate

ABSTRACT

Hydrophobic pollutants, in particular sediment-sorbed organic compounds, are widespread in the aquatic environment and could represent a threat to living organisms. Estuarine species, which live in turbulent ecosystems, are particularly exposed to this mode of contamination. For precise evaluation of the toxicity of hydrophobic contaminants desorbed from particles, a new larval assay using nauplii of the estuarine calanoid copepod *Eurytemora affinis* was developed. It consists of the direct exposure of copepods during naupliar development to elutriates of an unpolluted sediment spiked with different model contaminants. This bioassay measures the toxicity of the bioavailable fraction of particle-sorbed pollutants on the naupliar stage of copepods. Mortality and growth (non-invasive endpoints) in nauplii were analysed after six days of exposure. This approach was validated using six pollutants with different modes of action: benzo[a]pyrene (BaP), dimethylbenzo[a]anthracene (DMBA), phenanthrene (PHE), polychlorinated biphenyls (PCB 126, PCB 153) and 4-nonylphenol (4-NP). All these compounds induced a dose-dependent increase in toxic effects. Lethal effects only occurred at the highest tested concentrations: 58,541 and 6092 ng g⁻¹ dry weight sediment (dws), for PHE and DMBA, respectively. Sublethal effects (growth inhibition) were observed at lower concentrations for all tested compounds except PCB 153, from 8, 142, 297, 6092 and 8453 ng g⁻¹ dws for PCB 126, BaP, PHE, DMBA and 4-NP, respectively.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The Seine River drains the fourth largest watershed area in France (76,650 km²), and flows into the English Channel in the northwest of the country. This watershed is characterised by a high-density urban population (16 million inhabitants, mainly in Paris and its suburbs) and supports almost 40% of French economic activity (principally through the chemical industry), 30% of its agricultural activity and 50% of its river traffic. The Seine estuary is the largest megatidal estuary along the English Channel and an important international commercial shipping way, including the fifth largest European harbour in Le Havre. The increases in human population and industrial activity (e.g. automobile traffic, domestic heating, petrochemistry) over the last 50 years in the Seine River basin have resulted in increasing inputs of contaminants and particularly micro-organic contaminants (Cailleaud et al., 2007a, 2007b).

Among contaminants of concern, hydrophobic organic contaminants (HOCs), which include alkylphenols (APs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and polychlorobiphenyls (PCBs), as well as many pesticides, have been detected at high levels in many North Atlantic estuaries (Fernandez et al., 1997; Ko and Baker, 1995; Minier et al., 2006) and have been included in the priority pollutant lists of the United States Environmental Protection Agency (US-EPA) and the United Nations Economic Commission for Europe (UN-ECE Persistent Organic Pollutants Protocol; Lerche et al., 2002). The occurrence of high levels of PCBs and PAHs has been reported in the Seine River and its estuary (Cailleaud et al., 2007a, 2007b; Cachot et al., 2006; Minier et al., 2006; Moteley-Massey et al., 2002). These hydrophobic compounds persist in the aquatic environment, especially in sediment substrate considered as a reservoir of pollutants. These compounds can be resuspended by natural and/or anthropogenic phenomena (i.e. tides or dredging) in the water column and threaten the health of organisms (Meyer-Reil and Köste, 2000).

In recent years, European Union (EU) legislation has highlighted the need for ecotoxicological methods in the field for both *a priori* and *a posteriori* assessments of pollutant toxicity. On the one hand, EU chemical legislation requires the risk assessment of

* Corresponding author. Fax: +33 2 32 74 45 05.

E-mail addresses: joelle.leray@univ-lehavre.fr (J. Forget-Leray).

Table 1
Physicochemical and toxicological properties of the model organic compounds.

Compound	Structure	Log K_{ow}	Log K_{oc}	Water solubility ($\mu\text{g/L}$, 25 °C)
PAHs				
BaP	5 Rings	6.0	6.1	110
DMBA	4 Rings	6.6	5.8	18.9
PHE	3 Rings	4.6	4.4	1200
PCBs				
PCB 126	Coplanar	7.0	4.9	9.4
PCB 153	Non-coplanar	7.6	5.1	1.3
AP				
4-NP	1 Ring	6.0	4.8	1600

new substances before they can be accepted on the European market. In particular, short-term testing using invertebrates is required for all chemicals for which annual production or import is more than 10 t (REACH EC/1097/2006, 2006). On the other hand, the Water Framework Directive adopted in 2000 aims to establish a framework throughout the EU for the protection of inland surface waters (rivers and lakes), transitional waters (estuaries), coastal waters (to one nautical mile) and groundwater. Among invertebrates used in chemical testing, copepods represent relevant organisms due to their relatively small size and short life cycle. Early life stage copepod assays are suitable because these developmental stages are particularly sensitive to chemicals (Lotufo and Fleeger, 1997). Copepod larval assays enable the high-throughput screening of molecules, which saves time and money. For these reasons, lethal toxicity assays have been developed in marine copepods and standardised for chemical testing (ISO/CD 14669, 1999).

Estuarine copepods are particularly useful species to assess the toxicity of hydrophobic pollutants since they are continuously in contact with resuspended sediments. Actually, the Seine estuary is characterised by a dominant copepod species (crustacean, calanoid), *Eurytemora affinis*, which represents more than 90% of the zooplankton in the oligohaline zone and reaches higher densities than in other European estuaries (Devreker et al., 2010; Mouny and Dauvin, 2002). As a euryhaline species, the copepod *E. affinis* has been identified in many North Atlantic estuaries. This species is fundamental to the ecological equilibrium of local food webs and could contribute to the transfer of contaminants towards higher trophic levels. *E. affinis* undergoes sexual reproduction throughout the year. Its developmental cycle is divided into three successive phases with metamorphosis. The copepod goes through a naupliar phase (N1–N6), followed by copepodite (C1–C5), and finally reaches adulthood with sexual dimorphism. The total duration of the cycle ranges from 18 to 20 days, depending on abiotic environmental parameters (i.e. temperature and salinity; Devreker et al., 2009; Katona, 1970). Once fertilised, ovigerous females carry a bag containing eggs ('egg-bearing copepods'). The eggs develop (embryonic development) and then hatch (larval development). Recent studies showed that *E. affinis* can bioaccumulate hydrophobic compounds like PAHs, PCBs and APs. Thus, Cailleaud et al. (2007a, 2007b) conducted a series of studies on the bioaccumulation of these compounds in this species in the Seine estuary over several seasons. The bioaccumulation of PAHs, PCBs and APs varied in the ranges of 165–3866 ng g⁻¹ dws, 383–1785 ng g⁻¹ dws and 3423–6406 ng g⁻¹ dws, respectively.

The present work aims to develop a copepod larval assay specifically designed for assessing the toxicity of hydrophobic compounds associated with sediment. This bioassay by mimicking the special conditions of particle release observed in estuaries represents one of the current modes of contamination of organisms reflecting the bioavailable fraction of hydrophobic contaminants. The relevance of this bioassay was evaluated by incubating

nauplii of the estuarine copepod *E. affinis* with aqueous extracts of sediment spiked with different contaminants for the entire duration of naupliar development (six days). The selected endpoints (mortality and growth inhibition) represent markers that can be used to elaborate predictive models of effects at the population level.

2. Materials and methods

2.1. Organism sampling

Copepods were collected in the oligohaline part of the Seine estuary near Tancarville Bridge close to Le Havre (France; 49°28'19.24"/0°27'55.303"). The samples were collected under the surface using a WP2 plankton net (200 μm mesh size; 1 m diameter) as previously described by Cailleaud et al. (2007a). Immediately after sampling, copepods were sorted using two sieves (500 and 100 μm mesh size) in order to eliminate large particles and predators like *Mysidacea* and *Gammaridae*. Copepods were then transferred into isotherm containers using estuarine water and brought back to the laboratory. At the laboratory, copepods were sorted again using a 100 μm sieve and placed in artificial brackish water (mineral water Volvic, 5 PSU). These animals were maintained in laboratory in a climatized chamber under controlled conditions (5 PSU, 15 °C, 12:12 h light: dark photoperiod) and under aeration. They were fed *ad libitum* with *Isochrysis galbana* algae (approximately 10⁴ cells/mL; Aquacaux, Octeville sur Mer, France).

2.2. Chemical compounds

Six model toxicants, namely, BaP, DMBA, PHE, PCB 126, PCB 153 and 4-NP, were used in this study (Table 1). These compounds were chosen because of their high sorption capacity on particles and organic matter (log K_{oc} > 3), their high lipophilicity (log K_{ow} > 3), their different water solubility rates and their presence in the Seine estuary (Cachot et al., 2007; Cailleaud et al., 2007a, 2007b). All reagents and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) with the exception of PCB congeners, which were obtained from Promochem (Molsheim, France).

2.3. Reference sediment sampling and characterisation

The unpolluted sediment was collected in October 2007 at Yville-sur-Seine (Seine-Maritime, France) in a disused gravel pit. This site was chosen because it was previously shown to be marginally contaminated by organic and metallic pollutants (Cachot et al., 2006) and to lack any visible toxicity to Japanese medaka embryos (Cachot et al., 2007). The sediment was freeze-dried and then ground in a mortar to obtain thin homogeneous particulate matter. The particle-size distribution of the crushed sediment was determined by diffractometry (Malvern laser, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Dissolved ammonium and sulphide were measured in pore waters extracted from the sediment by centrifugation at 2831 g for 20 min. The freeze-dried sediment was remoistened under the same conditions as used for the bioassay. An aliquot of interstitial water was frozen at -25 °C for ammonium analysis. Dissolved ammonium was analysed by colorimetric procedures (Strickland and Parsons, 1972). Dissolved sulphide was determined from a second aliquot fixed with a 5% zinc acetate solution and stored frozen for subsequent spectrophotometric analysis by the methylene blue method (Cline, 1969). The particulate organic carbon concentration of the crushed sediment was measured on freeze-dried material by infrared spectroscopy using a LECO C-S 125, after removal of carbonates with 2 M HCl from 50 mg of powdered sample (Etcheber et al., 1999; Table 2).

2.4. Preparation of spiked sediments

The detailed procedure carried out for sediment spiking was described previously (Vicquelin et al., 2011). The freeze-dried reference sediment was spiked with increasing amounts of the test compound in order to obtain theoretical

Table 2
Physicochemical characteristics of the reference sediment from Vicquelin et al. (2011).

Particle-size distribution			Concentration			
D(v,0.10) (μm)	D(v,0.50) (μm)	D(v,0.90) (μm)	≤65 μm (%)	C_D (%)	S (μm)	N (μm)
41.25	229.9	390.91	13.02	0.14	11 ± 6	44 ± 6

concentrations of 0.5 ×, 1 ×, 5 ×, 25 × and 100 ×. The 1 × concentrations correspond to those measured in naturally contaminated sediments from the Seine estuary, that is, 500 ng g⁻¹ dws for BaP, DMBA, PHE and 4-NP and 20 ng g⁻¹ dws for PCB 126 and PCB 153 (Cachot et al., 2006). Briefly, a 250 mL glass-made round-bottomed flask was filled with the required amount of freeze-dried sediment and 2 mL g⁻¹ dws of dichloromethane. An adequate amount of test compound solved in isooctane (20 L g⁻¹ dws) was then added. The organic solvents were then evaporated in a rotavapor (Rapidvap Labconco, Kansas City, USA) set at 45 °C (approximately 45 min for 70 mL of dichloromethane) and the remaining solvent was removed by leaving the sediment in the dark overnight at room temperature. An aliquot of sediment (3 g dws) from each treatment was put aside for chemical analysis. Sediments were stored at -20 °C until use.

Coated sediments were analysed after extraction and re-concentration as previously described by Cailleaud et al. (2007a, 2007b), Thompson et al. (2002) and Vicquelin et al. (2011). Analysis of sediments was performed by GC/ECD, GC/MS and LC/MS/MS for PAHs, PCBs and 4-NP, respectively.

Coating efficiency was obtained by multiplying the measured concentration of spiked sediment by 100 and dividing it by the expected concentration of spiked sediment.

2.5. Larval assay

2.5.1. Exposure conditions

48 h before the experiment, ovigerous females were individually isolated from a tank into a 12-well microplate (Greiner Bio-One, France) containing 4 mL of artificial water (Volvic) adjusted to 5 PSU with natural marine salt. 24 h before the experiment, aqueous extraction of the sediment at 5 g L⁻¹ was performed by diluting 0.25 g of spiked sediment in 50 mL of 5 PSU artificial brackish water, which was then stirred overnight in the dark to avoid photodegradation. *E. affinis* nauplii were exposed to (1) unspiked sediment elutriate (blank control), (2) isooctane-spiked sediment elutriate (solvent control) or (3) model toxicant-spiked sediment elutriate. On the first day of the experiment, nauplii from clutches were sorted using a 100 µm sieve. Ten nauplii per replicate and three replicates per condition were randomly distributed in a crystalliser containing 10 mL of elutriate for six days. Microplates were covered in order to avoid evaporation and kept under controlled conditions for six days with a 12:12 h light:dark photoperiod in a climatised chamber (15 °C). Animals were fed *ad libitum* on the first and third days of the experiment with *I. galbana*.

2.5.2. Biological parameter monitoring

Larval viability was investigated by counting the number of living nauplii at the end of the experiment using a stereomicroscope (MZ75, Leica Microsystems). Larval growth was evaluated by subtracting the average body length of 50 nauplii measured at the beginning of the experiment from the total body length of living nauplii at the end of the experiment. Body length was assessed after formaldehyde fixation (2%) using the Leica Application Suite 2.7 software (Leica Microsystems).

2.6. Statistical analysis

Statistical procedures were carried out with the Statistica software v7 (Statsoft). Differences between solvent control and exposure conditions were tested by non-parametric analyses using the Kruskal–Wallis test ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Chemical analysis of spiked sediment

The unspiked sediment did not contain detectable amounts of BaP, DMBA, PHE, PCB 126 and PCB 153, but contained a small amount of 4-NP (Table 3). Coating efficiency ranged from 5% to 117%, according to the concentration and the nature of the studied compound.

3.2. Six-day larval bioassay

No significant difference was observed between blank and solvent controls in terms of both survival and growth (Table 4). The addition of solvent had no effect on the two endpoints. Only solvent control was thus considered in subsequent analyses.

The effects of PAHs are listed in Fig. 1. BaP caused a significant decrease in growth compared with the solvent from 142 ng g⁻¹ dws (Fig. 1A). A 60% inhibition of growth was observed at 22,395 ng g⁻¹ dws. In contrast, no significant effect was observed

Table 3

Chemical characterisation of spiked sediments (adapted from Vicquelin et al. (2011)).

Compounds	Nominal concentration	Theoretical concentration (ng g ⁻¹ dws)	Measured concentration (ng g ⁻¹ dws)	Coating efficiency (%)
PAHs				
<i>BaP</i>	0 ×	0.0	0.0	–
	0.5 ×	250.0	65.0	26
	1 ×	500.0	142.0	28
	5 ×	2500.0	818.0	33
	25 ×	12,500.0	5381.5	43
	100 ×	50,000.0	22,395.5	45
<i>DMBA</i>	0 ×	0.0	< 0.1	–
	0.5 ×	250.0	88.0	35
	1 ×	500.0	151.0	30
	5 ×	2500.0	853.0	34
	25 ×	12,500.0	6082.0	49
	100 ×	50,000.0	36,046.0	72
<i>PHE</i>	0 ×	0.0	0.0	–
	0.5 ×	250.0	12.0	5
	1 ×	500.0	297.0	59
	5 ×	2500.0	1398.0	55
	25 ×	12,500.0	6502.0	52
	100 ×	50,000.0	58,541.0	117
PCBs				
<i>PCB 126</i>	0 ×	0.0	0.1	–
	0.5 ×	10.0	4.0	40
	1 ×	20.0	8.0	40
	5 ×	100.0	37.0	37
	25 ×	500.0	176.0	35
	100 ×	2500.0	720.0	29
<i>PCB 153</i>	0 ×	0.0	0.8	–
	0.5 ×	10.0	6.0	60
	1 ×	20.0	12.0	60
	5 ×	100.0	80.0	80
	25 ×	500.0	341.0	68
	100 ×	2500.0	1350.0	54
AP				
<i>4-NP</i>	0 ×	0.0	55.0	–
	0.5 ×	250.0	136.0	54
	1 ×	500.0	482.0	98
	5 ×	2500.0	1225.0	49
	25 ×	12,500.0	8453.0	68
	100 ×	50,000.0	33,349.0	68

Table 4

Larval survival and growth after six days of exposure to blank and solvent controls ($n=10$ for survival, $n=30-50$ for growth). The data correspond to mean percentages of three independent replicates ± standard deviation (sd). Statistical analyses were performed by Kruskal–Wallis test ($p < 0.05$).

	Growth ± sd	Survival ± sd
Blank control	100 ± 9.6	82.2 ± 8.3
Solvent control	102 ± 9.6	82.2 ± 8.3

on survival. However, decreases in survival of 33% and 60% were observed for the two highest concentrations compared with that with the solvent. In the case of DMBA, decreases of 30% and 55% for growth and survival, respectively, were identified following exposure to 6082 ng g⁻¹ dws (Fig. 1B). No copepods survived upon exposure to the highest concentration. Finally, PHE induced significant decreases in growth from a concentration of 297 ng g⁻¹ dws, except at 1398 ng g⁻¹ dws, although a reduction of 16% was recorded (Fig. 1C). Decreases of 30%, 33% and 45% were respectively detected for 297, 6502 and 58,541 ng g⁻¹ dws. In addition, more than half of the copepods (55%) did not survive when exposed to 58,541 ng g⁻¹ dws.

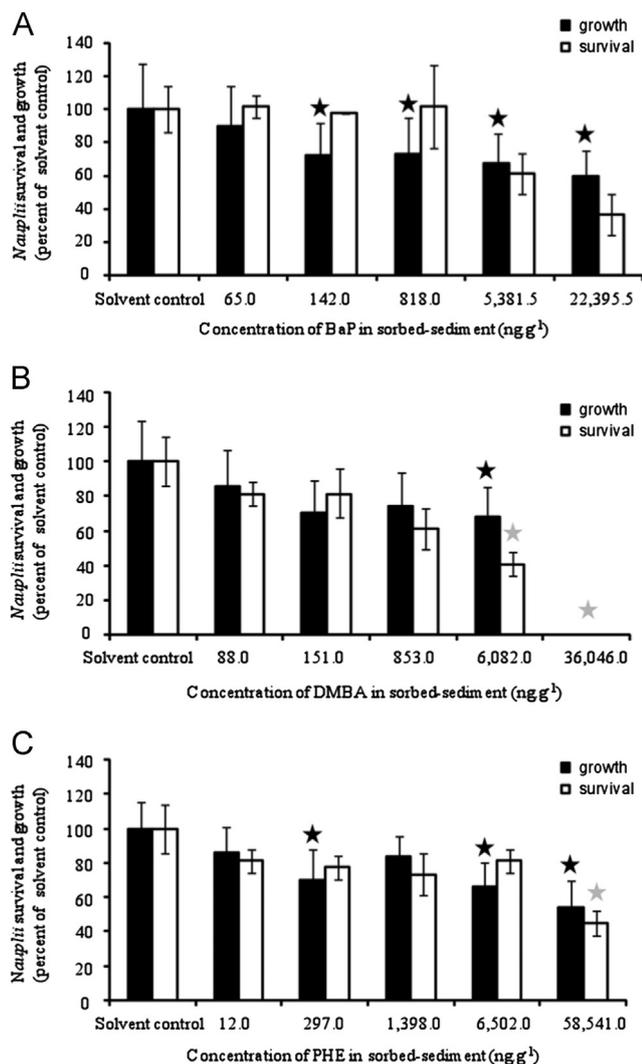


Fig. 1. Larval growth ($n=30-50$, black bars) and survival ($n=10$, white bars) upon exposure for six days to spiked sediments with different concentrations of BaP (A), DMBA (B) and PHE (C). Asterisks (black, growth; grey, survival) indicate significant differences in comparison with solvent control (Kruskal–Wallis test; $p < 0.05$).

The effects of PCBs are presented in Fig. 2. A significant reduction of growth (33%) was recorded for the two highest concentrations of PCB 126, namely, 176 and 720 ng L⁻¹ dws. However, no significant effect on survival was observed even if 60% of copepods did not survive during exposure to 176 and 720 ng g⁻¹ dws. No effect was observed for both endpoints after PCB 153 exposure. However, 20% decreases of growth and survival were observed at 341 and 1.35 ng g⁻¹ dws, respectively.

The observations for 4-NP are recorded in Fig. 3. A significant decrease of growth (33%) was observed for exposure at the two highest concentrations tested. No significant effect on survival was recorded, although a growth reduction of 60% was observed for both 8453 and 33,349 ng g⁻¹ dws exposures.

4. Discussion

In estuarine ecosystems, hydrophobic pollutants accumulated in sediment are resuspended in the water column by natural or anthropogenic activities. Thus, the impact of remobilised pollutants has become a major concern in ecotoxicology in recent years. This paper describes an easy-to-use and sensitive larval assay specifically designed for the toxicity assessment of hydrophobic

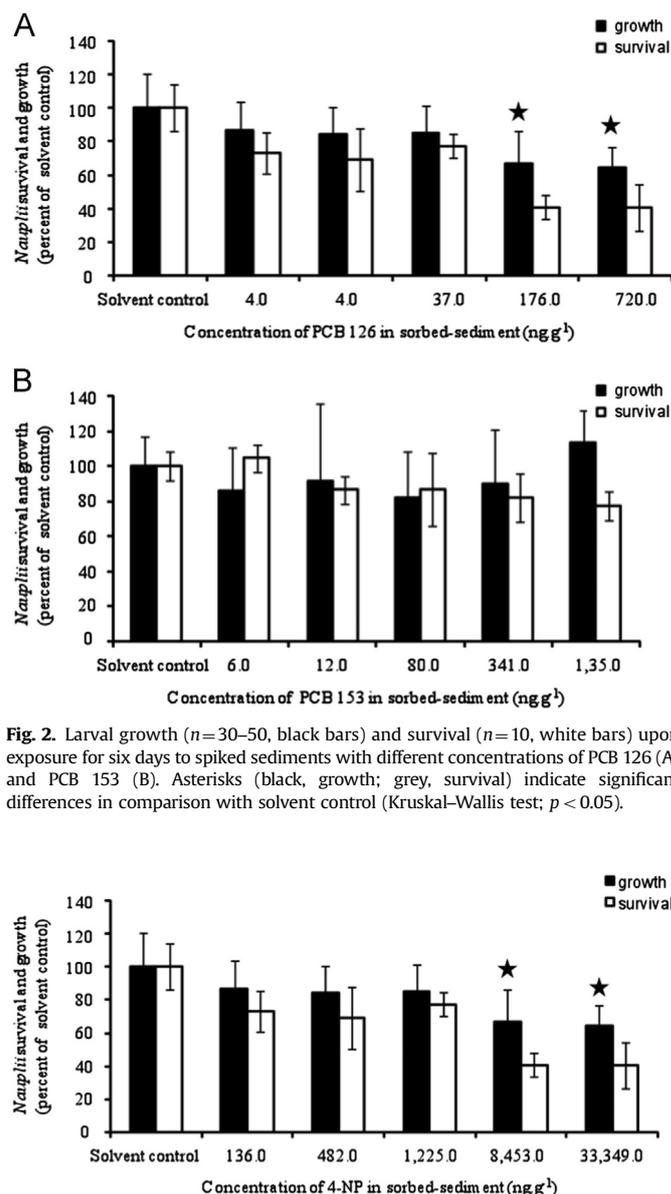


Fig. 2. Larval growth ($n=30-50$, black bars) and survival ($n=10$, white bars) upon exposure for six days to spiked sediments with different concentrations of PCB 126 (A) and PCB 153 (B). Asterisks (black, growth; grey, survival) indicate significant differences in comparison with solvent control (Kruskal–Wallis test; $p < 0.05$).

Fig. 3. Larval growth ($n=30-50$, black bars) and survival ($n=10$, white bars) upon exposure for six days to spiked sediments with different concentrations of 4-NP. Asterisks (black, growth; grey, survival) indicate significant differences in comparison with solvent control (Kruskal–Wallis test; $p < 0.05$).

substances resuspended in the water column. This biotest differs completely from the sediment contact assay and provides a new type of contamination that mimics actual contamination in estuarine ecosystems. The bioassay simply involves incubating *E. affinis* nauplii freshly clutched for six days in elutriates of 5 g of spiked sediment per litre, that is, the concentration of suspended particle matter measured in the Seine estuary (Cailleaud et al., 2007a). This approach is based on the use of early larval stages (N2–N6), known to be the stages most sensitive to pollutants (Barata et al., 2002; Guo et al., 2012; Green et al., 1986; Lotufo and Fleeger, 1997; McCahon and Pascoe, 1988). Lethal and sublethal effects were then monitored in exposed larvae. Three families of model toxicants were used to validate the bioassay: PAHs (BaP, DMBA and PHE), PCBs (PCB 126 and PCB 153) and AP (4-NP). These contaminants were chosen according to their potential different modes of action and their occurrence in the Seine estuary (Cailleaud et al., 2007a, 2007b). Most current bioassays require a minimum survival rate of 80% in the controls (US-EPA, 1994).

This criterion was satisfied in our experiments since the lowest survival rate in control conditions was 82%.

In the present study, at the end of the experiments, naupliar growth was affected at lower concentrations than mortality. Our experiments provided evidence that larval growth is a sensitive tool for assessing sediment-associated toxicity. Turesson et al. (2007) reported similar results with a harpacticoid copepod, *Attheyella crassa*. They showed experimentally that *A. crassa* naupliar body length was more sensitive than naupliar mortality to exposure to the pesticide Tebuconazole. Thus, LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) sediment was $500 \mu\text{g g}^{-1}$ dws for naupliar body length and $1800 \mu\text{g g}^{-1}$ dws for naupliar mortality.

The impact of PAHs has been extensively studied in vertebrates and increasingly in invertebrates. Many studies have shown that PAHs have harmful effects on the physiology of invertebrates, including on oxygen uptake, reproduction and feeding rates in species such as mussels (Donkin et al., 1989), branchiopods (Geiger and Buikema, 1981) and copepods (Lotufo and Fleeger, 1997; Neff, 1985). More recently, it has been reported that PAHs had the ability to interact with the ecdysteroidal system and can be considered as endocrine disruptors (Oberdöster and Cheek, 2001). Studies have demonstrated that exposure to PAHs had deleterious effects on growth by affecting the moulting process. In particular, Oberdöster et al. (2000) reported that exposure to pyrene significantly reduced moulting and reproduction in the shrimp *Palaemonetes pugio*.

In our study, BaP had no significant effect on the survival of *E. affinis* nauplii after six days of exposure, despite a decrease of growth by 60%. Several studies have reported that BaP was not the most lethal PAH for crustaceans. Wirth et al. (1998) reported a survival rate of about 60% in larvae of the shrimp *P. pugio* exposed to a mixture of PAHs including 2100 ng g^{-1} dws BaP. In the copepod *Amphiascus tenuiremis*, BaP had no significant effect on survival up to a concentration of 2100 ng g^{-1} dws (Wirth et al., 1998). Bang et al. (2009) have documented these results over a wide range of BaP concentrations ranging from 30 to $100 \mu\text{g L}^{-1}$ in the copepod *Tigriopus japonicus*. Finally, Forget-Leray et al. (2005) reported that BaP had no effect on the survival of *E. affinis* nauplii at concentrations up to $12 \mu\text{g L}^{-1}$. In contrast, sublethal toxicity occurred at relatively low concentrations. A significant decrease in the growth of *E. affinis* nauplii appeared upon exposure to BaP from as low as 142 ng g^{-1} dws. In agreement with this, literature data tend to show that BaP has an effect on the growth of both vertebrates and invertebrates. For example, Winckler et al. (1983) reported that larvae of the fish *California grunion* exhibited delayed development when exposed to BaP at a concentration of $24 \mu\text{g L}^{-1}$. More recently, Bang et al. (2009) reported growth retardation in larvae of the copepod *T. japonicus* exposed to $1 \mu\text{g L}^{-1}$ BaP. Similarly, Forget-Leray et al. (2005) demonstrated that nauplii of *E. affinis* exposed to $12 \mu\text{g L}^{-1}$ BaP grew more slowly than controls.

Although DMBA is not environmentally relevant, it is a PAH prototype, known to exhibit cytotoxic, mutagenic and immunotoxic properties, and is widely used as a model in cancer research (Miyata et al., 2001). Strong lethality was observed for DMBA in our experiment. These results contradict those obtained by Vicquelin et al. (2011) on Japanese medaka, for which no effect on survival was observed. In terms of growth, our experiments highlighted retardation among nauplii exposed to high concentrations of DMBA. Most of the literature data on DMBA—generally collected from vertebrate studies are inconsistent. In fact, some studies have shown that DMBA had no effect on growth in fish (Rhodes et al., 2005; Vicquelin et al., 2011), while others have shown the opposite (Bourne and Jones, 1973). However, the lack of information about the exposure of crustaceans to DMBA makes comparisons with literature data difficult.

It is now well known that PHE is a very toxic compound and a major environmental contaminant. In this study, the survival

of *E. affinis* nauplii was affected from a PHE concentration of $58,541 \text{ ng g}^{-1}$ dws after six days of exposure. Our results are in agreement with observations in the literature. In particular, Lotufo and Fleeger (1997) described that survival decreased in larvae of the copepods *Nitroca lacustris* and *Schizopera knabeni* from a PHE concentration of $45,000 \text{ ng g}^{-1}$ dws. Similarly, Lotufo and Fleeger (1997) reported a reduction of survival among adults of the copepod *S. knabeni* after 96 h of exposure to 514 ng g^{-1} . Growth of *E. affinis* nauplii exposed to PHE at concentrations from 297 ng g^{-1} was delayed compared with that of the control. However, the literature data conflict regarding the effect of PHE on organism growth and development. Lotufo and Fleeger (1997) showed in *N. lacustris* that all the nauplii developed into copepodites during exposure to PHE, whereas a delay was observed in larval development of the copepod *S. knabeni* from $22 \mu\text{g g}^{-1}$ dws after 10 days of exposure. These results indicate that PHE toxicity varies depending on the copepod species and the developmental stage. Notably, *E. affinis* and *S. knabeni* seem to be more sensitive than *N. lacustris* to PHE exposure.

Two subfamilies of PCBs are clearly established, namely, coplanar dioxin-like and non-coplanar PCBs. Coplanar PCBs such as PCB 126 are compounds with high toxicity to embryos and teratogenicity in fish, as shown by Kim and Cooper (1999) and Vicquelin et al. (2011) in Japanese medaka. Non-coplanar PCBs such as PCB 153 are ortho-chlorinated compounds known for their potential to affect moulting in crustacean species and to disrupt endocrine systems (Zou and Fingerman, 1997). Our results showed that PCB 126 had no significant effect on the survival of nauplii of the copepod *E. affinis*. In vertebrates, Vicquelin et al. (2011) showed that PCB 126 significantly reduced the survival of larvae of Japanese medaka at concentrations of 37 and 88 ng g^{-1} dws. In crustaceans, studies reported that dioxin-like PCBs have a significant effect on survival, but at concentrations much higher than those used in our experiments. For example, Zou and Fingerman (1997) evaluated the LC_{50} of *D. magna* exposed for 96 h to 0.59 mg L^{-1} PCB 29, which has a structure similar to that of PCB 126. More recently, Nakari and Huhtala (2008) showed that all *D. magna* organisms died after three days of exposure to $50 \mu\text{g L}^{-1}$ PCB 126. Conversely, no significant effect was observed in the copepod *T. japonicus* exposed to $600 \mu\text{g L}^{-1}$ PCB 126 (Guo et al., 2012). A significant decrease in the growth of nauplii exposed to PCB 126 was observed in our experiments. Literature data show that the effect of coplanar PCBs varies depending on the species. Firstly, in fish, Vicquelin et al. (2011) reported a significant decrease in the growth of larval Japanese medaka exposed to 37 and 88 ng g^{-1} PCB 126. Similarly, in the crustacean *D. magna*, Zou and Fingerman (1997) reported a significant decrease of entry into the moulting process during exposure to PCB 29 (0.05 and 0.10 mg L^{-1}). In contrast, Guo et al. (2012) did not observe any significant effect on growth in the copepod *T. japonicus*. In the case of PCB 153, we did not observe any effect on survival in the copepod *E. affinis* nauplii after six days of exposure. Similar results were observed in fish larvae of Japanese medaka at the same concentration (Vicquelin et al., 2011). However, in the crustacean *D. magna*, Zou and Fingerman (1997) reported a 96 h LC_{50} of 0.23 mg L^{-1} during exposure to Aroclor 1242, a PCB with a structure closely related to PCB 153. No effect of PCB 153 on growth was observed in our experiments. Similar results were observed in Japanese medaka (Vicquelin et al., 2011). In contrast, in crustaceans, Zou and Fingerman (1997) reported a significant decrease of growth of *D. magna* when exposed to 0.05 and 0.10 mg L^{-1} Aroclor 1242.

The toxicity of alkylphenols has been demonstrated in several studies on aquatic organisms. The APs are endocrine disruptors in vertebrates (Drèze et al., 2000) and invertebrates (Oberdöster and Cheek, 2001). In our experiments, no effect on survival was

observed after six days of exposure to 4-NP, which agrees with reports in the literature of the lethal effects of 4-NP at very high concentrations in fish and crustaceans. For example, in the fish Japanese medaka, lethality only appeared at the highest concentration tested (i.e. 33,349 ng g⁻¹ dws; Vicquelin et al., 2011). Recent studies have shown that 4-NP had no significant effect on the survival of the mysid *Americamysis bahia*, during exposure ranging from 0.3 to 30 µg L⁻¹ (Hirano et al., 2009). In other crustaceans such as copepods, effects on survival were observed at very high concentrations and corroborated our observations. In particular, the LC₅₀ of 32 mg L⁻¹ and 38 mg L⁻¹ were calculated in *T. japonicus* and *E. affinis*, respectively (Andersen et al., 2001; Forget-Leray et al., 2005). Moreover, we highlighted a developmental delay in *E. affinis* nauplii exposed to 8453 and 33,349 ng g⁻¹ dws 4-NP. In fish, Vicquelin et al. (2011) showed that 4-NP had no significant effect on the growth of Japanese medaka. Several studies have focused on the effect of APs on moulting crustaceans. In particular, Zou and Fingerman (1999a, 1999b) reported a delay in moulting in the crab *Uca pugilator* after 4-(tert)-octylphenol exposure. Hirano et al. (2009) also showed that environmental concentrations of NP caused a delay of moulting in the shrimp *A. bahia*. Andersen et al. (2001) identified growth inhibition in nauplii of the copepod *Acartia tonsa* during exposure to p-octylphenol. Moreover, Forget-Leray et al. (2005) have shown that 4-NP caused a delay in moulting of *E. affinis*.

The differences in effects between species suggest different modes of action of hydrophobic compounds in vertebrates and invertebrates, supporting the need to develop tools on different species. Moreover, our results suggest that the parameter of growth is more sensitive than survival, as demonstrated by Guo et al. (2012).

5. Conclusion

We have designed a relatively rapid and sensitive test with the freshwater calanoid copepod *E. affinis*, which enables the assessment of particle-bound pollutants. We tested a large panel of model compounds known for their ability to adsorb on sediment. This ecotoxicological test covering part of the life cycle of *E. affinis* revealed that this species is relatively sensitive to AP, PAHs and PCBs released from particles. All tested substances induced clear concentration-dependent responses for the analysed endpoint of growth, leading to naupliar body length being considered as a more sensitive endpoint than survival. The few reports of previous studies on sediment with similar toxicants confirmed our results. Our study shows that compounds adsorbed onto particles can be remobilised and threaten the health of marine or estuarine organisms. This work constitutes the essential validation step before assessment of the toxicity of natural sediments.

Acknowledgments

This study was supported by the TOXSEINE Project of GIP Seine-Aval, Haute-Normandie (France).

References

- Andersen, H.R., Wollenberger, L., Halling-Sorensen, B., Kusk, K.O., 2001. Development of copepod nauplii to copepodites a parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2821–2829.
- Bang, H.W., Lee, W., Kwak, I.-S., 2009. Detecting point as developmental delay based on the life-history development and urosome deformity of the harpacticoid copepod, *Tigriopus japonicus sensu lato*, following exposure to benzo(a)pyrene. *Chemosphere* 76, 1435–1439.
- Barata, C., Baird, J.D., Medina, M., Albalat, A., Soares, A., 2002. Determining the ecotoxicological mode of action of toxic chemicals in meiobenthic marine organisms: stage-specific short tests with *Tisbe battagliai*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 230, 183–194.
- Bourne, E.W., Jones, R.W., 1973. Effect of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) in fish cells *in vitro*. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 92, 140–142.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., LeMenach, K., Peluhet, L., Devier, M. H., Couteau, J., Pottier, D., Budzinski, H., 2006. Evidence of genotoxicity associated to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat. Toxicol.* 79, 257–267.
- Cachot, J., Law, M., Pottier, D., Peluhet, L., Norris, M., Budzinski, H., Winn, R., 2007. Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the transgenic medaka. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7830–7836.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Soussi, S., Hilde, D., LeMenach, K., Budzinski, H., 2007a. Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoida, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70, 270–280.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Soussi, S., Lardy, S., Agagneur, S., Budzinski, H., 2007b. Seasonal variation of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoid, copepod). Part 2: alkylphenol-polyethoxylates. *Chemosphere* 70, 281–287.
- Cline, J.D., 1969. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 14, 454–458.
- Devreker, D., Souissi, S., Winkler, G., Forget-Leray, J., Leboulenger, F., 2009. Effects of salinity and temperature on the reproduction of *Eurytemora affinis* (Copepoda; calanoida) from the Seine estuary: a laboratory study (the importance of individual variability). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 368, 113–123.
- Devreker, D., Souissi, S., Molinero, J.C., Beyrend-Dur, D., Gomez, F., Forget-Leray, J., 2010. Tidal and annual variability of the population structure of *Eurytemora affinis* in the middle part of the Seine Estuary during 2005. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 89, 245–255.
- Drèze, V., Cravedi, J.P., Biaganti-Risbourg, S., Le Gac, F., Monod, G., 2000. Effects of 4-nonylphenol on sex differentiation and puberty in Mosquito fish (*Gambusia holbrooki*). *Ecotoxicology* 9, 93–103.
- Donkin, P., Widdows, J., Evans, S.V., Worall, C.M., Carr, M., 1989. Quantitative structure-activity relationships for the effect of hydrophobic organic chemicals on rate feeding by mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Toxicol.* 14, 277–294.
- Etcheber, H., Relexans, J.C., Beliard, M., Weber, O., Buscaill, R., Heussner, S., 1999. Distribution and quality of sedimentary organic matter on the Aquitanian margin (Bay of Biscay). *Deep-Sea Res. II* 46, 2249–2288.
- Fernandez, M.B., Sicre, M.A., Boireau, A., Tronczynsky, J., 1997. Polyaromatic hydrocarbons (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 34, 857–867.
- Forget-Leray, J., Landriau, I., Minier, C., Leboulenger, F., 2005. Impact of contaminants on survival, development and reproduction of estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 288–294.
- Geiger, J.G., Buikema, A.L.J., 1981. Oxygen consumption and filtering rate of *Daphnia pulex* after exposure water-soluble fractions of naphthalene, phenanthrene, No. 2 fuel oil and coal-tar creosote. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27, 783–787.
- Green, D.W.J., Williams, K.A., Paseo, D., 1986. The acute and chronic toxicity of cadmium to different life history stages of the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 15, 465–471.
- Guo, F., Wang, L., Wang, W.-X., 2012. Acute and chronic toxicity of polychlorinated biphenyl 126 to *Tigriopus japonicus*: effects on survival, growth, reproduction, and intrinsic rate of population growth. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 639–645.
- Hirano, M., Ishibashi, H., Kim, J.-W., Matsumura, N., Arizono, K., 2009. Effects of environmentally relevant concentrations of nonylphenol on growth and 20-hydroxyecdysone levels in mysid crustacean, *Americamysis bahia*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 149, 368–373.
- ISO/CD 14669, 1999. Water quality—determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea).
- Katona, S.K., 1970. Growth characteristics of the copepods *Eurytemora affinis* and *E. herdmani* in laboratory cultures. *Helgol. Wiss. Meeresunters.* 20, 373–384.
- Kim, Y., Cooper, K.R., 1999. Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in the embryos and newly hatched larvae of the Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 39, 527–538.
- Ko, F.C., Baker, J.E., 1995. Partitioning of hydrophobic organic contaminants to resuspended sediments and plankton in the mesohaline Chesapeake Bay. *Mar. Chem.* 49, 171–188.
- Lerche, D., Van de Plassche, E., Schwegler, A., Balk, F., 2002. Selecting chemical substances for the UN-ECE POP protocol. *Chemosphere* 47, 617–630.
- Lotufo, G.R., Fleeger, J.W., 1997. Effects of sediment-associated phenanthrene on survival, development and reproduction of two species of meiobenthic copepods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151, 91–102.
- Lotufo, G.R., 1998. Lethal and sublethal toxicity of sediment-associated fluoranthene to benthic copepods: application of the critical-body-residue approach. *Aquat. Toxicol.* 44, 17–30.
- McCahon, C.P., Pascoe, D., 1988. Use of *Gammarus pulex* (L.) in safety evaluation tests: culture and selection of a sensitive life stage. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 15, 245–252.
- Meyer-Reil, L.-A., Köste, M., 2000. Eutrophication of marine waters: effects on benthic microbial communities. *Mar. Pollut. Bull.* 41, 255–263.
- Minier, C., Abarnou, A., Jauen-Madoulet, A., Le Guellec, A.M., Tutudjan, R., Bocquéné, G., Leboulenger, F., 2006. A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine estuary, France,

- using Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*). Environ. Toxicol. Chem. 25, 112–119.
- Miyata, M., Furukawa, M., Takahashi, K., Gonzalez, J.F., Yamazoe, Y., 2001. Mechanism of 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced immunotoxicity: role of metabolic activation at the target organ. Pharmacol 86, 302–309.
- Moteley-Massey, A., Ollivon, D., Garban, B., Chevreil, M., 2002. Atmospheric deposition of toxics into the Seine Estuary, France: example of polycyclic aromatic hydrocarbons. Atmos. Chem. Phys. 2, 1351–1369.
- Mouny, P., Dauvin, J.C., 2002. Environmental control of mesozooplankton community structure in the Seine Estuary (English Channel). Oceanol. Acta 25, 13–22.
- Nakari, T., Huhtala, S., 2008. Comparison of toxicity of congener-153 of PCB, PBB, and PBDE to *Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 71, 514–518.
- Neff, J.M., 1985. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications. Hemisphere Publishing Corporation, Washington DC, pp. 416–454.
- Oberdöster, E., Brouwer, M., Hoexum-Brouwer, T., Manning, S., McLachlan, J.A., 2000. Long-term pyrene exposure of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, affects molting and reproduction of exposed males and offspring of exposed females. Environ. Health Perspect. 180, 641–646.
- Oberdöster, E., Cheek, A.-O., 2001. The beach: endocrine disruption in marine and estuarine organisms. Environ. Toxicol. Chem. 20, 23–36.
- REACH EC/1097/2006, 2006. Regulation of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals OJ L 396, 849 pp.
- Rhodes, S., Farwell, A., Hewitt, L.M., MacKinnon, M., Dixon, D.G., 2005. The effects of dimethylated and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of the *Japanese Medaka*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 60, 247–258.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fish. Res. Board Can. Bull. 167, 1–31.
- Thompson, S., Budzinski, H., LeMenach, K., Letellier, M., Garrigues, P., 2002. Multi-residue analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorobiphenyls, and organochlorine pesticides in marine sediments. Anal. Bioanal. Chem. 372, 196–204.
- Turesson, E.U., Stiernström, S., Minten, J., Adolfsson-Erici, M., Bengtsson, B.E., Breitholtz, M., 2007. Development and reproduction of the freshwater harpacticoid copepod *Attheyella crassa* for assessing sediment-associated toxicity. Aquat. Toxicol. 83, 180–189.
- US Environmental Protection Agency, 1994. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. EPA/600/4-91/003, Cincinnati, OH.
- Vicquelin, L., Forget-Leray, J., Peluhet, L., LeMenach, K., Deflandre, B., Anschutz, P., Etcheber, H., Morin, B., Budzinski, H., Cachot, J., 2011. A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese Medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. Aquat. Toxicol. 105, 235–245.
- Winckler, D.L., Duncan, K.L., Hose, J.E., Puffer, H.W., 1983. Effects of benzo(a)pyrene on the early development of California grunion, *Leuresthes tenuis* (pisces, atherinidae). Fish. Bull. 81, 473–481.
- Wirth, E.F., Fulton, M.H., Chandler, G.T., Key, P.B., Scott, G.I., 1998. Toxicity of sediment associated PAHs to the estuarine crustaceans, *Palaemonetes pugio* and *Amphiascus tenuiremis*. Environ. Contam. Toxicol. 61, 637–644.
- Zou, E., Fingerman, M., 1997. Effects of estrogenic xenobiotics on molting of the water flea, *Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 38 (3), 281–285.
- Zou, E., Fingerman, M., 1999a. Effects of estrogenic agents on chitinase activity in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugnator*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 42, 185–190.
- Zou, E., Fingerman, M., 1999b. Effects of exposure to diethyl phthalate, 4-(tert)-octylphenol, and 2,4,5-trichlorobiphenyl on activity of chitinase in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugnator*. Comp. Biochem. Phys. C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol. 122, 115–120.

1 **TOXICITY OF SEDIMENT-BOUND POLLUTANTS IN THE SEINE ESTUARY,**
2 **FRANCE, USING A *EURYTEMORA AFFINIS* LARVAL BIOASSAY**

3
4 **Teddy Lesueur^a, Céline Boulangé-Lecomte^a, Gwendal Restoux^b, Julien Deloffre^c, Benoît**
5 **Xuereb^a, Karyn Le Menach^d, Hélène Budzinski^d, Nathalie Petrucciani^a, Sabine Marie^a,**
6 **Fabienne Petit^c and Joëlle Forget-Leray^{a*}**

7
8 ^aUMR-I 02 SEBIO, FED 4116, ULH, Normandie University, BP 1123 F-76063, Le Havre,
9 France

10 ^bUMR 8079 UPS CNRS ENGREF, University Paris-Sud, F-91405, Orsay cedex, France

11 ^cUMR CNRS 6143 M2C, FED 4116, UR, Normandie University, F-76821, Mont Saint
12 Aignan, France

13 ^dUMR CNRS 5805 EPOC-LPTC, Bordeaux University, F-33405, Talence, France

14
15
16 ***Author to whom correspondence should be addressed:**

17 Tel.: +33 2 32 85 99 08; fax: +33 2 32 74 45 05

18 E-mail address: joelle.leray@univ-lehavre.fr

19
20
21 **Abstract**

22
23 Coastal urbanisation exposes surrounding estuarine environments to urban-related
24 contaminants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorobiphenyls (PCBs)
25 and pesticide mixtures. Hydrophobic contaminants can adsorb on estuarine sediments. They
26 can subsequently be released on a massive scale in the aquatic environment due to artificial or
27 natural phenomena (*e.g.* dredging, tides), threatening living organisms. The contamination of
28 sediment is a significant ecological issue in the Seine estuary, France. However, few relevant
29 methods have been developed to assess sediment toxicity and its ecological impacts in a cost-
30 effective way. In this context, we aimed to assess the toxicity of natural sediments from the
31 Seine estuary in terms of the effects on the development of the calanoid copepod *Eurytemora*
32 *affinis* using a previously developed larval bioassay. This assay involves direct exposure of
33 nauplii to elutriates of sediments for six days. Sediments were collected along the Seine
34 estuary from six polluted sites and one reference site. Pollutants in this estuary included
35 PAHs, PCBs and OCPs (organochlorine pesticides). Nauplius survival was significantly

36 affected by exposure to all contaminated sediment elutriates, in comparison to that with
37 sediment from Yville-sur-Seine (the reference site), whereas nauplius growth was
38 significantly reduced after exposure to contaminated sediment elutriates from four of the six
39 contaminated sites. We identified two distinct site clusters, one including both the sand-rich
40 and the least polluted sediments (Oissel, Quillebeuf-sur-Seine, Caudebec-en-Caux) and the
41 other including both the clay- and silt-rich and the most polluted sediments (La Bouille,
42 Poses, Pont de Normandie). As expected, survival was significantly more impacted after
43 exposure to elutriates from the second cluster than from the first. This work enables (i)
44 assessment of the toxicity of natural sediments in the Seine estuary and (ii) validation of the
45 larval bioassay previously developed using sorbed sediment with model molecules.

46

47 Key words: copepod, elutriate, hydrophobic pollutant, nauplius, HAP, PCB

48

49 **1. Introduction**

50

51 The Seine estuary watershed covers approximately 76,650 km², ranking as the fourth
52 largest river basin in France. This estuary, which flows into the English Channel in the
53 northwest of the country, is situated in a temperate area characterised by a high-density urban
54 population (around 16 million inhabitants, mainly in Paris and Rouen conurbations) and
55 supports almost 40% of French economic activity, 30% of its agricultural activity and 50% of
56 its river traffic. As this last statistic suggests, the Seine estuary is also an important shipping
57 way, including the fifth largest European harbour in Le Havre. The increases in human
58 population and urban activities over the last 50 years in the Seine River basin have resulted in
59 increasing anthropogenic inputs of contaminants and particularly micro-organic pollutants
60 (Cailleaud et al., 2007a, b). The estuary is divided into three parts as illustrated in Fig. 1:
61 upper (or fluvial), middle and lower (or marine) estuary. The dynamic tide is propagated
62 upstream over a distance of 158 km from the mouth at Le Havre [kilometric point (Kp) 360,

63 with reference point Kp 0 situated at Pont Marie in Paris] to the dam at Poses (Kp 202). The
64 upper estuary only contains fresh water; although subject to the river tide, its regime is
65 dominated by fluvial discharge (Vrel et al., 2013). The mean water flow in the Seine estuary
66 measured at Poses dam is $460 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, ranging from a few tens of $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ to $2,800 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
67 (Vigarié, 1964; Idlafkih et al., 1997). The mean annual mass of suspended particulate matter
68 (SPM) due to the river discharge is estimated to be $6.10^5 \text{ t} \cdot \text{year}^{-1}$, with marked variations over
69 years, from 1.3×10^5 to $1.7 \cdot 10^6 \text{ t} \cdot \text{year}^{-1}$ (Lesourd et al., 2003). In the Seine estuary, 80% of this
70 SPM is present during the high-river-flow period (Meybeck et al., 2002). Sediment plays an
71 important role in the transport and degradation of contaminants, particularly in estuarine
72 domains. Sediment is considered as a reservoir of pollutants, especially for hydrophobic
73 organic contaminants (HOCs), which can be adsorbed on particles (Hack et al., 2008). They
74 can then be resuspended in the water column by natural and/or anthropogenic phenomena
75 (e.g. tides or dredging), potentially threatening the health of aquatic ecosystems. Among
76 HOCs, investigations in the Seine estuary were carried out on emblematic compounds, such
77 as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBs) with
78 concentrations in the SPM from 499 to $5,819 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ dws (dry weight sediment) and from 58 to
79 $463 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ dws, respectively (Cailleaud et al., 2007a). These contaminants can also
80 accumulate in estuarine organisms throughout the food chain. Recent studies showed that the
81 calanoid copepod *Eurytemora affinis* can bioaccumulate hydrophobic compounds such as
82 alkylphenols (APs), PAHs and PCBs (Cailleaud et al., 2007a, b). The bioaccumulation of
83 APs, PAHs and PCBs varied in this copepod in the ranges of 3,423–6,406, 165–3,866 and
84 383–1,785 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ dws, respectively. The presence of organochlorine pesticides (OCPs) has
85 also been reported in the Seine estuary at low concentrations, namely, $5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ in water and
86 $1\text{--}10 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ TSS (total suspended solids), particularly in the state of environmental footprint.

87 Concentrations of OCPs in the copepod *E. affinis* ranged from 15 to 40 ng.g⁻¹ (Cailleaud,
88 2006).

89 HOCs have been included in the priority pollutant lists of the United Nations Economic
90 Commission for Europe (UN-ECE Persistent Organic Pollutants; Lerche et al., 2002).
91 Moreover, the evaluation of estuary quality is becoming a major issue. The application of a
92 rapid and inexpensive bioassay offers an ideal alternative for monitoring estuaries, but few
93 bioassays have been developed and applied at such sites. In this context, the objective of the
94 present study was to evaluate the effects of natural sediments of the Seine estuary on the
95 copepod *E. affinis* by using a larval bioassay developed by Lesueur et al. (2013). *E. affinis* is
96 known as an emblematic species of the Seine estuary, which represents more than 90% of the
97 zooplankton in its oligohaline zone (Devreker et al., 2010; Mouny and Dauvin, 2002). As a
98 zooplanktonic species, *E. affinis* could contribute to the transfer of contaminants towards
99 higher trophic levels. *E. affinis* undergoes sexual reproduction throughout the year. Once
100 fertilised, females carry a bag containing eggs ('egg-bearing copepods'). These eggs develop
101 in ovigerous females (embryonic development) and then hatch (larval development). As
102 described by Katona (1971), the *E. affinis* larval cycle is divided into successive phases,
103 namely, naupliar (N1–N6) and copepodite (C1–C5). The total duration of its developmental
104 cycle ranges from 18 to 20 days, depending on abiotic environmental parameters (*i.e.*
105 temperature and salinity; Devreker et al., 2009; Katona, 1970). The *E. affinis* larval bioassay,
106 which was previously validated using sediments spiked with model molecules, allows
107 assessment of the toxicity of the bioavailable fraction of sediment-bound HOCs (Lesueur et
108 al., 2013). In the present work, nauplii of the copepod *E. affinis* were exposed throughout
109 their entire larval development to elutriates of natural sediments collected along the Seine
110 estuary in order to evaluate their toxic effects on survival and growth. The observed effects on
111 larval development were analysed against the chemical and physical characteristics of the

112 sediment samples in order potentially to link any biological effects with a characteristic
113 sediment profile.

114

115 **2. Materials and methods**

116 **2.1. Organism sampling and maintenance**

117 Copepods were collected at Tancarville in the oligo-mesohaline part of the Seine
118 estuary (France; 49°28'19.24"/0°27'55.303"; Kp 337). The samples were collected under the
119 surface using a WP2 plankton net (200- μm mesh size; 1-m diameter) as previously described
120 by Cailleaud et al. (2007a). Plankton samples were directly sorted on site using two sieves
121 (500- and 100- μm mesh sizes) in order to eliminate large particles and predators like
122 *Mysidacea* and *Gammaridae*. Copepods were then transferred into isotherm containers using
123 estuarine water and carried back to the laboratory. At the laboratory, the copepods were sorted
124 again using a 100- μm sieve and placed in filtered (0.33 μm) and UV-treated natural seawater
125 adjusted to salinity 15 with distilled water. The animals were maintained in a climatic
126 chamber under optimal conditions (*i.e.* salinity 15, 15°C, 12:12-h light:dark photoperiod) and
127 under constant aeration (Devreker et al., 2009). They were fed *ad libitum* with *Isochrysis*
128 *galbana* algae (approximately 15,000 cells/mL).

129

130 **2.2. Sediment sampling**

131 Sediments were collected in February 2009 at a time of high river flow (river flow:
132 643.31 $\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$) along a longitudinal transect at seven locations along the Seine estuary
133 (France) from the mouth to upstream: Pont de Normandie, Quillebeuf-sur-Seine, Caudebec-
134 en-Caux, La Bouille, Oissel and Poses (Fig. 1), along with the collection of reference
135 sediment in October 2007 at Yville-sur-Seine in a disused gravel pit without a connection to
136 the Seine River (Fig. 1). The oxic surface layers of sediments were systematically collected at

137 low tide using an aluminium spoon and were stored in aluminium containers at -80°C for
138 further analyses. The reference sediment was pyrolysed (500°C, 6 hours) before freezing.

139

140 ***2.3. Sediment characterisation***

141 ***2.3.1. Particle-size distribution of sediments***

142 The particle-size distribution, that is, percentage of clay (< 2 µm), silt (2 to 63 µm) or
143 sand (63 to 2,000 µm) in the sampled sediments, was obtained by diffractometry using a
144 Beckman Coulter LS230.

145

146 ***2.3.2 Contaminant analysis of sediments***

147 Natural freeze sediments were crushed to obtain fine homogeneous particular matter,
148 lyophilised and stored at room temperature in amber bottles glasses into the dark. Lyophilised
149 sediments were analysed using GC/ECD and GC/MS after extraction and reconcentration, as
150 previously described by Cailleaud et al. (2007a, b) and Thompson et al. (2002). The reference
151 sediment from Yville-sur-Seine was previously described to be marginally contaminated by
152 organic and metallic pollutants, but lacking any visible toxicity to Japanese medaka embryos
153 (Cachot et al., 2006, 2007; Vicquelin et al., 2011).

154

155 ***2.4. Larval bioassay***

156 ***2.4.1. Exposure conditions***

157 After two weeks of acclimatisation and two days before exposure, ovigerous females
158 were individually isolated from the stabulation tank using a glass pipette and placed in a net
159 (33-µm mesh size) immersed in a tank containing 2 L of natural seawater that had been
160 filtered (0.33 µm), UV-treated and adjusted to salinity 15 with distilled water. In parallel,
161 aqueous extraction of potential contaminants from natural sediments was performed by

162 diluting 0.25 g of sediment in 50 mL of filtered and UV-treated seawater adjusted to salinity
163 15, under agitation overnight in the dark to avoid photodegradation. *E. affinis* nauplii were
164 exposed to elutriates from either the reference sediment (Yville-sur-Seine) or the
165 contaminated sediments (Pont de Normandie, Quillebeuf-sur-Seine, Caudebec-en-caux, La
166 Bouille, Oissel, Poses). On the first day of the experiment, nauplii from clutches were sorted
167 using a 100- μ m sieve. Ten nauplii per replicate and three replicates per condition were
168 randomly distributed in a crystalliser containing 10 mL of elutriate for six days, as previously
169 described by Lesueur et al. (2013). Crystallisers were covered in order to avoid evaporation
170 and kept under controlled conditions with a 12:12-h light:dark photoperiod in the climatic
171 chamber (15°C). The animals were fed *ad libitum* on the first and third days of the experiment
172 with *Isochrysis galbana* (15,000 cells/mL).

173

174 **2.4.2. Biological parameter monitoring**

175 Larval survival was investigated by counting the number of live nauplii at the end of the
176 experiment using a stereomicroscope (MZ75, Leica Microsystems). Larval growth was
177 evaluated by subtracting the average body length of 50 nauplii measured at the beginning of
178 the experiment from the total body length of living nauplii at the end of the experiment. Body
179 length was assessed after formaldehyde fixation (2%) using the Leica Application Suite 2.7
180 software (Leica Microsystems).

181

182 **2.5. Statistical analyses**

183 All statistical analyses were conducted using the statistical environment R 3.1.1 (R Core
184 Team, 2014). Relationships between chemical (PAHs, PCBs, OCPs) and physical (clays, silts,
185 sands) variables of sediments were investigated by principal component analysis (PCA) using
186 the ade4 R package (Dray and Dufour, 2007).

187 The classification of site and sediment variables was computed using hierarchical
188 clustering on average distance (UPGMA) on centred and scaled variables. The obtained
189 dendrograms were then presented within a heatmap.

190 Growth variations among sites were analysed using a linear model with sites as a fixed
191 effect. Survival variations were analysed using a generalised linear model considering a
192 binomial error distribution and a logit function to transform the data. Then, subsequent
193 pairwise comparisons between control and sites and among sites were carried out using the
194 contrasts between least-squares means with respect to multiple test correction with Tukey's
195 tests implemented in the lsmeans R package (Lenth, 2014). Comparisons between clusters of
196 sites obtained with the dendrograms were conducted the same way as for site comparisons.

197 Finally, a Pearson correlation test was carried out to determine the correlation between
198 survival and growth.

199

200 **3. Results**

201 *3.1 Composition and particle-size distribution of the contaminated sediments from the* 202 *Seine estuary*

203 The results of the pollutant analysis are reported in Table 1. PAHs, PCBs and OCPs
204 were detected in all sampled sediments. The PAH contamination was around 4,000 ng.g⁻¹ in
205 the sediment from Pont de Normandie, La Bouille and Oissel. This rate was four times lower
206 in the sediment from Quillebeuf-sur-Seine (1,096 ng.g⁻¹), whereas it was more than two times
207 higher in the sediments from Caudebec-en-Caux (9,862 ng.g⁻¹) and Poses (9,613 ng.g⁻¹).
208 Moreover, the PCB and OCP rates, respectively, ranged from 9 (Caudebec-en-Caux) to 174.2
209 ng.g⁻¹ (Pont de Normandie) and from 1 (Caudebec-en-Caux) to 17.9 ng.g⁻¹ (Poses).

210 While clay content was rather consistent in the sediment, ranging from 3.2% to 5.5%,
211 the silt and sand fractions varied widely, from 49.3% to 79.5% for silt and 15.1% to 46.3% for

212 sand (Table 2). Sediments from Pont de Normandie, La Bouille and Poses were particularly
213 clay-rich, with rates higher than 70%.

214

215 ***3.2 Classification of sampling sites by PCA analysis according to their physico-chemical*** 216 ***properties***

217 Six variables (PAHs, PCBs, OCPs, clay, silt, sand) for each sampling site were included
218 in the principal component analysis (Fig. 2). The percentages of inertia explained by the first
219 five principal axes are reported in Fig. 2A. The first two components explained 92.9% of the
220 observed variance. Two axes were thus considered as sufficient to represent nearly the entire
221 inertia of the dataset. The subsequent correlation circle (Fig. 2B) well represented all
222 considered variables since they were very close to the edges of the circle of radius 1.
223 Although the PAH variable was not related to any other variables, PCBs and OCPs were
224 correlated to silt and clay composition of sediments and negatively correlated to the level of
225 sand. This observation was confirmed in the heatmap (Fig. 2C). The dendrogram of the sites
226 highlighted two distinct clusters: (i) cluster 1, including both the sand-rich and the least
227 polluted sediments (Oissel, Quillebeuf-sur-Seine, Caudebec-en-Caux), and (ii) cluster 2,
228 including both the clay- and silt-rich and the most polluted sediments (La Bouille, Poses, Pont
229 de Normandie).

230

231 ***3.3 Six-day larval bioassay***

232 Survival of nauplii exposed to the reference sediment elutriate (Yville-sur-Seine) for six
233 days reached 96.7% (Fig. 3A). In comparison, nauplius survival was negatively and
234 significantly affected after exposure to all contaminated sediment elutriates. Survival was
235 particularly impacted after exposure to the sediment elutriate from La Bouille, with a decrease
236 of 33.3%. Moreover, larval survival was significantly more impacted after exposure to the

237 elutriates from sites of cluster 2 (including the clay- and silt-rich and the most polluted
238 sediments: La Bouille, Poses, Pont de Normandie) than to those from sites of cluster 1
239 (including the sand-rich and the least polluted sediments, *i.e.* Oissel, Quillebeuf-sur-Seine,
240 Caudebec-en-Caux) (z-ratio=2.40, p=0.043).

241 The larval growth of *E. affinis* was defined as 100% after six-day exposure to the
242 reference sediment elutriate (Fig. 3B). Nauplius growth was significantly reduced by 23.3%
243 to 28.7% after exposure to contaminated sediment elutriates from Quillebeuf-sur-Seine,
244 Caudebec-en-Caux, La Bouille and Poses. In contrast, no significant effect on naupliar growth
245 was detected after exposure to elutriates from Pont de Normandie and Oissel. Moreover, no
246 significant difference in larval growth between site clusters was identified (Table 3). Finally,
247 no correlation between naupliar survival and growth was found (Fig. 3C; $r=0.63$, $p=0.1306$).

248

249 **4. Discussion**

250 Despite their ecological importance, estuaries have traditionally been used as
251 convenient sites for disposing of urban sewage and industrial effluents, and have also received
252 contaminated water through their tributaries. They are now highly polluted by organic
253 contaminants present in both sediment and the water column. Hydrophobic pollutants
254 accumulated in sediment are resuspended in the water column by natural or anthropogenic
255 activities. Thus, the development of tools to assess sediment toxicity, in particular the impact
256 of remobilised pollutants, has become a major concern in ecotoxicology (Hack et al., 2008).
257 The present study describes the application, with natural sediments from the Seine estuary, of
258 a previously developed larval bioassay using the copepod *E. affinis* (Lesueur et al., 2013).
259 This bioassay is an easy-to-use, low-cost and sensitive larval assay specifically designed to
260 assess the toxicity of hydrophobic substances resuspended in the water column. This biotest
261 thus differs completely from sediment-contact bioassays since it mimics actual contamination

262 from sediment in estuarine ecosystems. It is based on the use of early developmental stages
263 (N2–N6), known to be the most sensitive to pollutants (Barata et al., 2002; Guo et al., 2012).
264 Lethal and sub-lethal effects were then monitored in larvae exposed to elutriates of natural
265 sediment collected from six different sites along the Seine estuary. Sediment samples were
266 collected in February, during high river flow when rising water is common, which
267 corresponds to the period when the resuspension of sediment is most important.

268 All sampled sediments included the three emblematic contaminant families of the Seine
269 estuary, namely, HAPs, PCBs and OCPs (Cailleaud, 2006; Cailleaud et al., 2007a; Fernandes
270 et al., 2007). *E. affinis* naupliar survival was systematically impacted after exposure to the
271 sediment elutriates, whereas naupliar growth was altered in four of the six cases. The
272 biological effects of sediment elutriate exposure on *E. affinis* nauplii are widely consistent
273 with literature data, which show that PAHs, PCBs and OCPs can strongly impact the health of
274 organisms, in particular by reducing both survival and growth. PAHs are, in particular, known
275 for their lethal effects on crustaceans. Indeed, a mix of PAHs reduced survival by 40% in the
276 shrimp *Palaemonetes pugio* (Wirth et al., 1998). Moreover, Bang et al. (2009) showed that
277 benzo[a]pyrene (BaP, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) reduced the survival of the copepod *Tigriopus japonicus*.
278 Similarly, *E. affinis* nauplius survival was affected after exposure to both BaP in solution (12
279 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and elutriates from sediments spiked with phenanthrene or
280 dimethylbenzo[a]anthracene (Forget-Leray et al., 2005; Lesueur et al., 2013). The effects of
281 PAHs on the physiology of organisms, including effects on growth and reproduction
282 (Oberdöster et al., 2000), on oxygen uptake, and on feed rate in species such as mussels
283 (Donkin et al., 1989), branchiopods (Geiger and Buikema, 1981) and copepods (Lotufo, 1998;
284 Neff, 1985), are also well documented (Ball and Truskewycz, 2013). Otherwise, survival and
285 reproduction can be impacted by PCB exposure, as demonstrated in *Tigriopus japonicus*
286 exposed to PCB 126 (Guo et al., 2012). Significant decreases in growth were also reported in

287 crustaceans such as in *Daphnia magna* when exposed to Aroclor 1242, a compound related to
288 PCB 153 (0.05 to 0.10 mg.L⁻¹; Zou and Fingerman, 1997) and in *E. affinis* after exposure to
289 PCB 126-spiked sediments (Lesueur et al., 2013). Finally, numerous OCPs are considered as
290 endocrine disruptors, which have effects on reproduction and growth. Thus, Xi and colleagues
291 demonstrated altered reproductive function of the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus*
292 Pallas (2007). Moreover, Snyder and Mulder (2001) reported a delay in moulting in the
293 decapod *Homarus americanus* after exposure to heptachlor, a cyclodiene pesticide. Similarly,
294 Brown et al. (2003) reported that lindane slowed development to adulthood in the copepod
295 *Bryocamptus zschokkei*.

296 The biological effects highlighted in the present study were not specifically correlated
297 with one class of contaminants over the others (data not shown): they thus resulted from the
298 exposure to a mixture of compounds. While literature data dealing with the toxicity of
299 xenobiotics alone abound, few studies have focused on the effects of compounds in a mixture,
300 in spite of their ecological relevance (Ball and Truskewycz, 2013); however, the present
301 bioassay can contribute to filling this gap. Few studies have also been conducted on the
302 toxicity of sediments from the anthropised Seine estuary. However, a sediment-contact
303 bioassay using Japanese medaka embryos was used to investigate the toxicity of the same
304 sediments as those of the present study (Vicquelin, 2011). On the one hand, Vicquelin and
305 colleagues only described the effects on embryonic survival upon exposure to sediment from
306 La Bouille, Oissel and Poses, corresponding to the upstream Seine estuary area. On the other
307 hand, growth retardation of Japanese medaka embryos was recorded upon exposure to
308 sediment from Poses, whereas *E. affinis* growth was also affected after exposure to sediment
309 elutriates from three other sites. The *E. affinis* naupliar bioassay thus seems to be more
310 sensitive than the Japanese medaka embryo bioassay. However, these studies stress the
311 difficulty of comparing the effects between vertebrates and invertebrates, especially when

312 different methods of contamination are used, and emphasise the necessity of designing
313 specific bioassays to evaluate the toxicity of contaminants.

314 The position of the sites along the upstream-downstream transect had no influence on
315 the growth and survival of *E. affinis* nauplii. In addition, the state of sediment contamination
316 was not linked to the upstream-downstream positions of the sites; in fact, for each site, the
317 major source of contamination is from Pont de Normandie to Poses dam, such as heavy traffic
318 and major industrial activities, which can explain the high levels of contaminants all along the
319 estuary. In line with this, the highest concentrations of PAHs, PCBs and OCPs were
320 respectively measured in sediments from Caudebec-en-Caux, Pont de Normandie and Poses,
321 namely, in the middle, lower and upper estuary. These observations appear to be consistent
322 with data in the literature, since Fernandes et al. (1997) reported that the position along the
323 transect had no influence on the concentration of PAHs in the sediment. For example, PAH
324 contamination in sediment from Poses (near the dam) was $4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, while it was $6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ in the
325 middle estuary (*i.e.* Vieux-Port). Similarly, no link between the location of the sites along the
326 estuary and PCB contamination was highlighted, even though Poses and Oissel were the most
327 contaminated (Narbonne et al., 2004).

328 Despite the lack of any correlation between the biological effects of sediment exposure
329 and the transect location of the sampling sites, we demonstrated a link between biological
330 effects, in particular the survival endpoint, and the physico-chemical properties of sediments.
331 Indeed, fine particle-rich sediment was found to be more contaminated and to be more likely
332 to induce altered larval development, in accordance with the fact that the silt and clay fraction
333 ($<63 \mu\text{m}$ fraction) is a primary carrier of adsorbed chemicals and is the fraction widely
334 suspended by artificial or natural phenomena, for example, dredging or tides.

335

336 **5. Conclusion**

337 After developing a larval bioassay on sediment coated with model molecules, this assay
338 has been applied in the field for the study of natural sediments. In this work, nauplii of the
339 copepod *E. affinis* were exposed to natural sediments collected along a transect upstream and
340 downstream of the Seine estuary throughout the duration of larval development.

341 This bioassay is intended to characterise the contamination of hydrophobic compounds
342 and their effects on the survival and growth of a very representative species of the Seine
343 estuary. Sediments of the Seine estuary clearly seem to be toxic, especially during floods.
344 Survival and growth of the copepod *E. affinis* seem to be assigned to many sites of the Seine
345 estuary, without correlation with their position along the upstream-downstream transect.
346 Moreover, reasonably, sediments rich in fine particles were shown to be highly contaminated
347 and to induce higher mortality of nauplii, which contributes to validate our larval bioassay
348 that enables assessment of the actual toxicity of the bioavailable fraction of particle-sorbed
349 pollutants.

350

351 **Acknowledgment**

352 This study was supported by the TOXSEINE project of GIP Seine-Aval, Haute-Normandie
353 (France). The authors wish to thank Jérôme Cachot and Ludovic Vicquelin for their assistance
354 in the field.

355

355 **Bibliography**

- 356 Ball A., Truskewycz A., 2013. Polyaromatic hydrocarbon exposure: an ecological impact
 357 ambiguity. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 4311–4326.
- 358 Bang H.W., Lee W., Kwak I-S., 2009. Detecting point as developmental delay based on the
 359 life-history development and urosome deformity of the harpacticoid copepod,
 360 *Tigriopus japonicus sensu lato*, following exposure to benzo(a)pyrene. *Chemosphere*
 361 76, 1435–1439.
- 362 Barata C., Baird J.D., Medina M., Albalat A., Soares A., 2002. Determining the
 363 ecotoxicological mode of action of toxic chemicals in meiobenthic marine organisms:
 364 stage-specific short tests with *Tisbe battagliai*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 230, 183–194.
- 365 Brown R.J., Rundle S.D., Hutchinson H.T., Williams T.T., Jones M.B., 2003. A copepod life-
 366 cycle test and growth model for interpreting the effect of lindane. *Aquat. Toxicol.* 63,
 367 1–11.
- 368 Cachot J., Geffard O., Augagneur S., Lacroix S., LeMenach K., Peluhet L., Devier M.H.,
 369 Couteau J., Pottier D., Budzinski H., 2006. Evidence of genotoxicity associated to
 370 high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy,
 371 France). *Aquat. Toxicol.* 79, 257–267.
- 372 Cachot J., Law M., Pottier D., Peluhet L., Norris M., Budzinski H., Winn R., 2007.
 373 Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the
 374 transgenic medaka. *Environ. Sci. Technol.* 41, 7830–7836.
- 375 Cailleaud K., 2006. La qualité de l'eau en estuaire de Seine - Analyse pluridisciplinaire de la
 376 contamination organique via l'utilisation du modèle animal *Eurytemora affinis* - Etude
 377 *in situ* et expérimentale. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, Bordeaux, p. 220.
- 378 Cailleaud K., Forget-Leray J., Soussi S., Hilde D., LeMenach K., Budzinski H., 2007a.
 379 Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-
 380 column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora*
 381 *affinis* (Calanoïda, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70, 270–280.
- 382 Cailleaud K., Forget-Leray J., Soussi S., Lardy S., Agagneur S., Budzinski H., 2007b.
 383 Seasonal variation of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-
 384 column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora*
 385 *affinis* (Calanoïd, copepod). Part 2: Alkylphenol-polyethoxylates. *Chemosphere* 70,
 386 281–287.
- 387 Deloffre J., Lafite R., Lesueur P., Lesourd S., Verney R., Guézennec L., 2005. Sedimentary
 388 processes on a intertidal mudflat in the upper macrotidal Seine estuary, France. *Estuar.*
 389 *Coast. Shelf S.* 64, 710–720.
- 390 Devreker D., Souissi S., Winkler G., Forget-Leray J., Leboulenger F., 2009. Effects of salinity,
 391 temperature and individual variability on the reproduction of *Eurytemora affinis*
 392 (Copepoda; Calanoïda) from the Seine estuary: a laboratory study. *J. Exp. Mar. Biol.*
 393 *Ecol.* 368, 113–123.
- 394 Devreker D., Souissi S., Molinero J.C., Beyrend-Dur D., Gomez F., Forget-Leray J., 2010.
 395 Tidal and annual variability of the population structure of *Eurytemora affinis* in the
 396 middle part of the Seine Estuary during 2005. *Estuar. Coast. Shelf S.* 89, 245–255.
- 397 Donkin P., Widdows J., Evans S.V., Worall C.M., Carr M., 1989. Quantitative structure-
 398 activity relationships for the effect of hydrophobic organic chemicals on rate feeding
 399 by mussel (*Mitylus edulis*). *Aquat. Toxicol.* 14, 277–294.
- 400 Dray S., Dufour A.B., 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for
 401 ecologists. *J. Stat. SoftW.* 22, 1-20.

402 Forget-Leray J., Landriau I., Minier C., Leboulenger F., 2005. Impact of endocrine toxicants
403 on survival, development and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora*
404 *affinis* (Poppe). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 288–294.

405 Fernandes M.B., Sicre M.A., Boireau A., Tronczynsky J., 1997. Polyaromatic hydrocarbons
406 (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 34, 857–867.

407 Geiger J.G., Buikema A.L.J., 1981. Oxygen consumption and filtering rate of *Daphnia pulex*
408 after exposure water-soluble fractions of naphthalene, phenanthrene, No. 2 fuel oil and
409 coal-tar creosote. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27, 783–787.

410 Guo F., Wang L., Wang W-X., 2012. Acute and chronic toxicity of polychlorinated biphenyl
411 126 to *Tigriopus japonicus*: Effects on survival, growth, reproduction, and intrinsic
412 rate of population growth. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 639–645.

413 Hack L.A., Tremblay L.A., Wratten S.D., Forrester G., Keesing V., 2008. Toxicity of
414 estuarine sediments using a full life-cycle bioassay with the marine copepod
415 *Robertsonia propinqua*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 469–474.

416 Idlafkih Z., Meybeck M., 1997. Comportement des métaux particuliers (Al, Fe, Mn, Cd, Cu,
417 Hg, Pb, Zn) dans la Seine à Poses en période de hautes eaux (1990-1995). *Freshwater*
418 *Contamination (Proceedings of Rabat Symposium S4)*. 243, p. 81.

419 Katona S. K. 1970. Growth characteristics of the copepods *Eurytemora affinis* and
420 *Eurytemora hermani* in laboratory cultures. *Helgoländer Meeresun.* 20, 373–384

421 Katona S.K., 1971. The developmental stages of *Eurytemora affinis* (Poppe, 1880)
422 (Copepoda, Calanoida) raised in laboratory cultures, including a comparison with the
423 larvae of *Eurytemora americana* (Williams, 1906), and *Eurytemora herdmani*
424 (Thompson & Scott, 1897). *Crustaceana* 21, 5–20.

425 Lerche D., Van de Plassche E., Schwegler A., Balk F., 2002. Selecting chemical substances
426 for the UN-ECE POP protocol. *Chemosphere* 47, 617–630.

427 Lesourd S., Lesueur P., Brun-Cotten J.C., Garnaud S., Poupinet N., 2003. Seasonal variations
428 in the characteristics of superficial sediments in a macrotidal estuary (the Seine inlet,
429 France). *Estuar. Coast. Shelf S.* 58, 3–16.

430 Lesueur T., Boulangé-Lecomte C., Xuereb B., Budzinski H., Cachot J., Vicquelin L., Giusti-
431 Petrucciani N., Marie S., Petit F., Forget-Leray J., 2013. Development of a larval
432 bioassay using the calanoid copepod, *Eurytemora affinis* to assess the toxicity of
433 sediment-bound pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 94, 60–66.

434 Lotufo G.R., 1998. Bioaccumulation of sediment-associated fluoranthene in benthic
435 copepods: uptake, elimination and biotransformation. *Aquat. Toxicol.* 44, 1–15.

436 Meybeck M., Lestel L., Bonté P., Moilleron R., Colin J.L., Rousselot O., Hervé D., Pontevès
437 C., Grosbois C., Thévenot D.R., 2007. Historical perspective of heavy metals
438 contamination (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) in the Seine River basin (France) following a
439 DPSIR approach (1950-2005). *Sci. Total Environ.* 375, 204–231.

440 Mouny P., Dauvin J.C., 2002. Environmental control of mesozooplankton community
441 structure in the Seine Estuary (English Channel). *Oceanol. Acta* 25, 13–22.

442 Narbonne J-F., Guarrigues P., Budzinski H., Morin B., Augagneur S., Clerandau C., Mora
443 P., 2004. Etude de la contamination chimique de l'estuaire de la Seine par l'utilisation
444 de biomarqueurs, de bioessais et couplage avec analyses chimiques. Programme Seine
445 Aval 2. Rapport annuel 2003. p. 49.

446 Neff J.M., 1985. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Fundamentals of Aquatic Toxicology:*
447 *Methods and Applications*. Hemisphere Publishing Corporation Washington DC, p.
448 416–454.

449 Oberdöster E., Brouwer M., Hoexum-Brouwer T., Manning S., McLachlan J.A., 2000. Long-
450 term pyrene exposure of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, affects molting and

451 reproduction of exposed males and offspring of exposed females. Environ. Health
452 Perspect. 180, 641–646.

453 Snyder J.M., Mulder P.E., 2001. Environmental endocrine disruption in decapod crustacean
454 larvae: hormone titers, cytochrome P450, and stress protein responses to heptachlor
455 exposure. Aquat. Toxicol. 55, 177–190.

456 Thompson S., Budzinski H., LeMenach K., Letellier M., Garrigues P., 2002. Multi-residue
457 analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorobiphenyls, and
458 organochlorine pesticides in marine sediments. Anal. Bioanal. Chem. 372, 196–204.

459 Vicquelin L., 2011. Caractérisation fine de la toxicité des hydrocarbures aromatiques
460 polycycliques (HAPs) vis à vis des embryons et larves de poissons. Contribution à
461 l'évaluation des risques environnementaux associés à la pollution dans l'estuaire de
462 Seine. Thèse de doctorat, Université du Havre, Le Havre, p. 223.

463 Vicquelin L., Forget-Leray J., Peluhet L., LeMenach K., Deflandre B., Anschutz P., Etcheber
464 H., Morin B., Budzinski H., Cachot J., 2011. A new spiked sediment assay using
465 embryos of the Japanese Medaka specifically designed for a reliable toxicity
466 assessment of hydrophobic chemicals. Aquat. Toxicol. 105, 235–245.

467 Vigarié A., 1964. Etude critique de la documentation sur l'évolution morphologique de
468 l'estuaire de la Seine. Thèse complémentaire, Paris, p. 239.

469 Vrel A., Boust D., Lesueur P., Deloffre J., Dubrulle-Brunaud C., Solier L., Rozet M.,
470 Thouroude C., Cossonet C., Thomas S., 2013. Dating of sediment record at two
471 contrasting sites of the Seine river using radioactivity data and hydrological time
472 series. J. Environ. Radioactiv. 126, 20–31.

473 Wirth E.F., Fulton M.H., Chandler G.T., Key P.B., Scott G.I., 1998 Toxicity of sediment
474 associated PAHs to the estuarine crustaceans, *Palaemonetes pugio* and *Amphiascus*
475 *tenuiremis*. Environ. Contam. Toxicol. 61, 637–644.

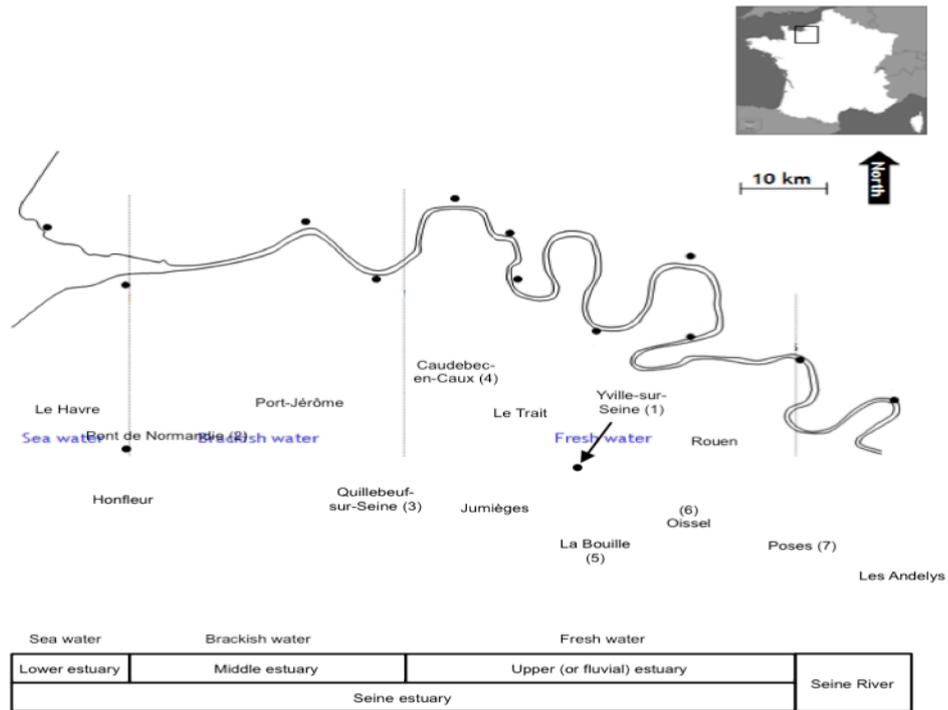
476 Xi Y.L., Chu Z.X., Xu X.P., 2007. Effect of four organochlorine pesticides on the
477 reproduction of freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus pallas*. Environ. Toxicol.
478 Chem. 26, 1695–1699.

479 Zou E., Fingerman M., 1997. Effects of estrogenic xenobiotics on molting of the water flea,
480 *Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 38, 81–85.

481

482

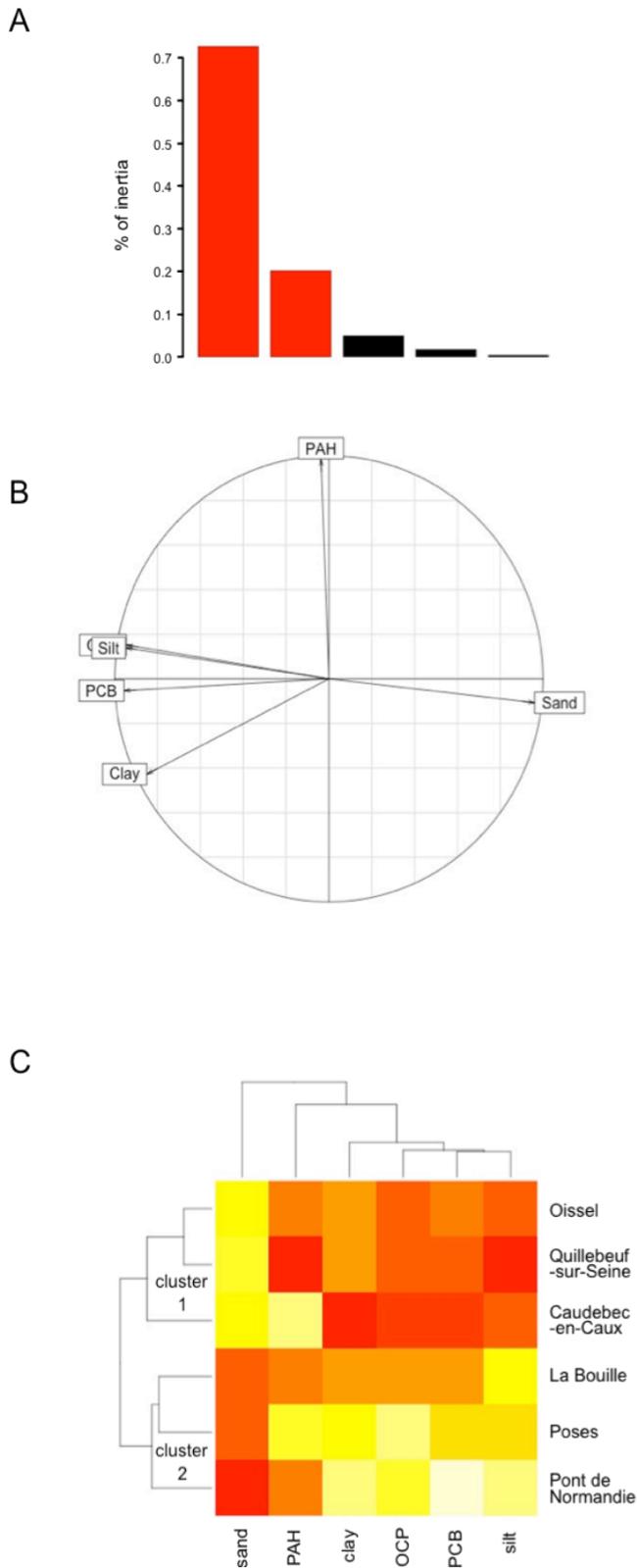
482 **Figure captions**



483

484 **Fig. 1.** Sediment sampling sites along the Seine estuary (France). (1) Yville-sur-Seine
 485 (reference site), (2) Pont de Normandie, (3) Quillebeuf-sur-Seine, (4) Caudebec-en-Caux, (5)
 486 La Bouille, (6) Oissel, (7) Poses (adapted from Deloffre et al., 2005).

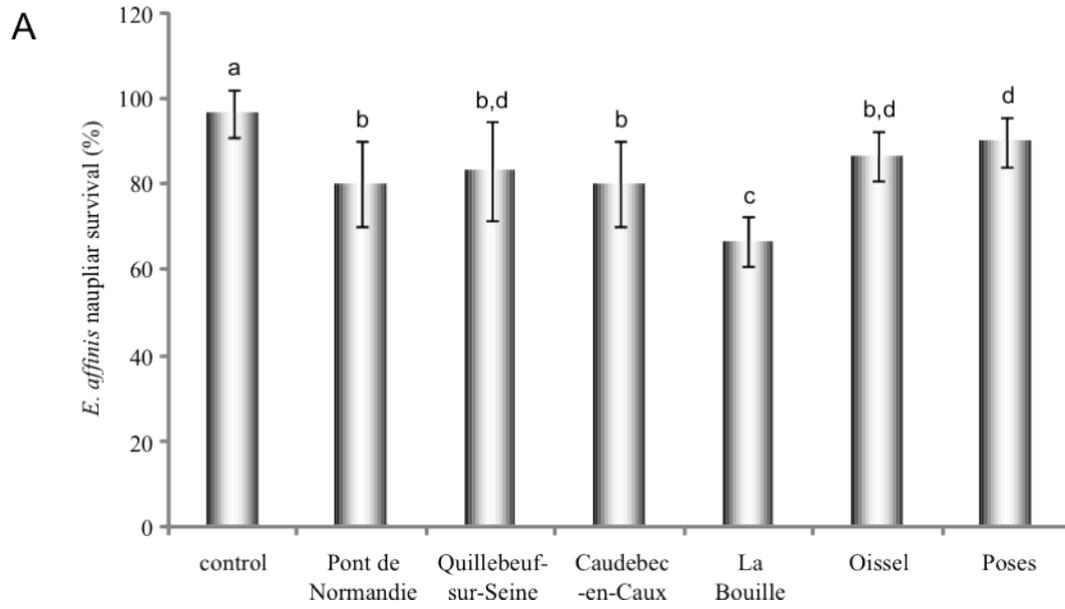
487



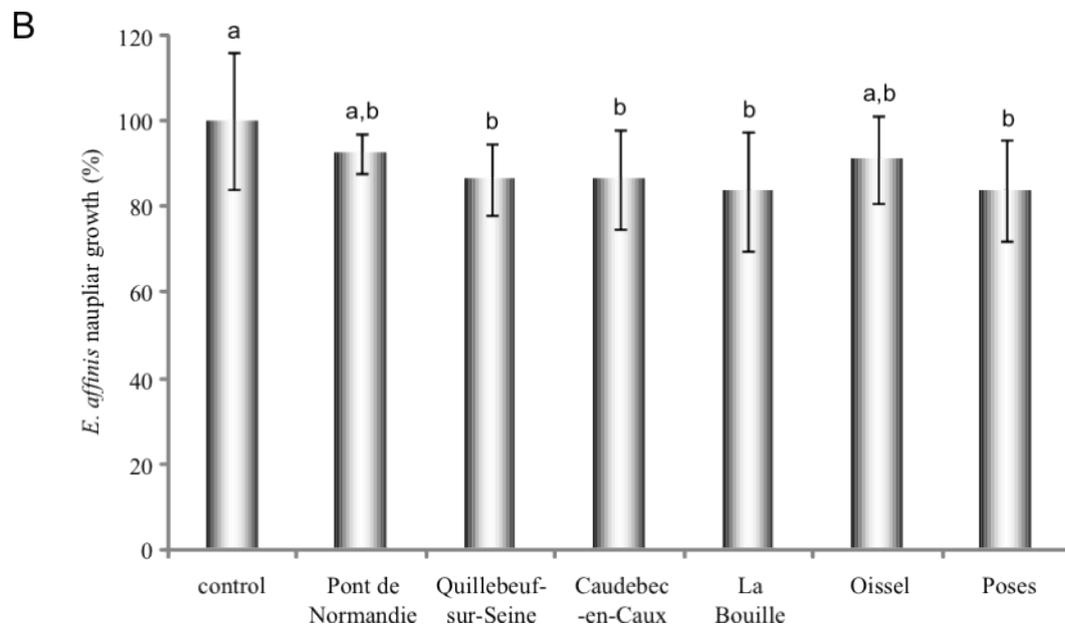
487

488 **Fig. 2.** Relationships between chemical and physical variables of natural sediments from the
 489 Seine estuary by principal component analysis (PCA). Six variables (PAHs, PCBs, OCPs,
 490 clay, silt, sand) for each sampling site (Pont de Normandie, Quillebeuf-sur-Seine, Caudebec-

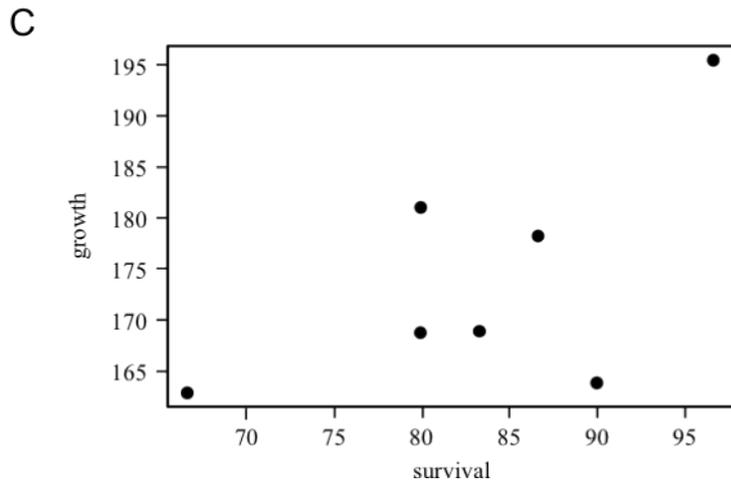
491 en-Caux, La Bouille, Oissel and Poses) were included in the PCA. (A) Percentage of inertia
492 explained by the orthogonal axes obtained by PCA. (B) Correlation circle of the six variables
493 according to the first two axes (92.9% of inertia explained). (C) Heatmap of the physico-
494 chemical proprieties of natural sediments from the Seine estuary. The more intense the colour,
495 the less expressed the variable. Side dendrograms were computed using a UPGMA clustering
496 method.
497



497



498



499

500 **Fig. 3.** *E. affinis* larval survival and growth after six days of exposure to natural sediment
 501 elutriates from the Seine estuary (n=30–50). (A) *E. affinis* larval survival. Each bar represents
 502 the mean percentage of live nauplii \pm standard deviation of independent biological samples.
 503 Significant differences in survival between sediments from Yville-sur-Seine (control), Pont de
 504 Normandie, Quillebeuf-sur-Seine, Caudebec-en-Caux, La Bouille, Oissel and Poses are
 505 indicated by different letters ($p < 0.05$). (B) *E. affinis* larval growth. The growth of nauplii
 506 exposed to elutriate from the reference sediment (Yville-sur-Seine) was defined as 100%.
 507 Each bar represents the mean percentage of growth \pm standard deviation of independent
 508 biological samples. Significant differences in growth between sediments from Yville-sur-
 509 Seine (control), Pont de Normandie, Quillebeuf-sur-Seine, Caudebec-en-Caux, La Bouille,
 510 Oissel and Poses are indicated by different letters ($p < 0.05$). (C) Pearson correlation between
 511 *E. affinis* survival and growth after six days of exposure to natural sediment elutriates from
 512 the Seine estuary ($p < 0.05$).

513

513

514 **Table 1.** Concentrations of PAHs, PCBs and OCPs in sediments collected from the Seine
515 estuary (from Vicquelin et al., 2011).

Compounds	Pont de Normandie	Quillebeuf-sur-Seine	Caudebec-en-Caux	La Bouille	Oissel	Poses
Σ PAHs (ng.g ⁻¹)	3,979.0	1,096.0	9,862.0	4,499.0	4,197.0	9,613.0
Σ PCBs (ng.g ⁻¹)	174.2	12.9	9.0	54.8	34.1	94.3
Σ OCPs (ng.g ⁻¹)	16.0	2.9	1.0	8.1	2.8	17.9

516

517

517

518 **Table 2.** Percentages of clay, silt and sand in sediments collected from the Seine estuary.

	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)
Pont de Normandie	5.5	79.4	15.1
Quillebeuf-sur-Seine	4.4	49.3	46.3
Caudebec-en-Caux	3.2	54.0	42.8
La Bouille	4.4	72.8	22.8
Oissel	4.5	55.3	40.2
Poses	5.1	70.7	24.2

519

520

520

521 **Table 3.** Average survival and growth rates of each cluster of sampling sites from the Seine
522 estuary. Cluster 1 (Oissel, Quillebeuf-sur-Seine, Caudebec-en-Caux) and cluster 2 (La
523 Bouille, Poses, Pont de Normandie) were considered to represent the areas with low and high
524 levels of pollution, respectively.

		Average survival rate (\pm SEM)	Average growth rate (\pm SEM)
Control	Yville-sur-Seine	96.7% ^a	100% ^a
Cluster 1	Oissel	83.3% \pm 2.2 ^b	79.4% \pm 3.7 ^b
	Quillebeuf-sur-Seine		
	Caudebec-en-Caux		
Cluster 2	La Bouille	78.9% \pm 8.1 ^c	76.9% \pm 6.9 ^b
	Poses		
	Pont de Normandie		

525

526

L'intensité urbaine, les activités industrielles et agricoles situées sur le bassin versant de la Seine, font de l'estuaire de Seine, l'un des estuaires les plus pollués de l'hémisphère nord. Malgré la contamination chimique et microbiologique le copépe *E. affinis* représente 90 % de la biomasse zooplanctonique en estuaire de Seine. L'objectif de la thèse était de développer un nouveau Bio-essai Survie Croissance copépe (BASIC) à l'aide du copépe *E. affinis* sur différentes matrices environnementales. Dans un premier temps, le bio-essai a été mis au point à l'aide de sédiments enrobés avec des molécules modèles représentatives de la contamination estuarienne (AKPs, HAPS et PCBs) avant d'être validé, par la suite, sur des sédiments naturels de l'estuaire de Seine. Le bio-essai a ensuite été appliqué en solution au 4-NP et au PCB 126 (respectivement à $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $200 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) dans des conditions environnementales réalistes et sur *Vibrio anguillarum* issus de l'estuaire de Seine (à 10^1 et $10^6 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$). Enfin, en parallèle, un protocole d'exposition multi-générationnel a été appliqué dans les mêmes conditions afin d'observer les effets pendant trois générations. Les résultats recensés ont montré un effet sur le développement larvaire lors des expositions aux 4-NP, au PCB 126 et aux HAPs après 6 jours d'expositions à des sédiments enrobés. Dans le cadre des expositions en solution, des résultats similaires ont été obtenus, avec notamment, un retard de croissance après deux jours d'exposition au 4-NP et au PCB 126. En revanche, à la fin de l'expérimentation (après 6 jours, ce résultat n'est plus observé). Ce résultat est corrélé par les niveaux d'activité chitobiase, et les stades de développement obtenus tous les deux jours. Lors des expositions à *Vibrio anguillarum*, une augmentation de l'activité chitobiase a été enregistrée les premiers jours de l'exposition, avec pour conséquence une augmentation de la croissance visible dès le sixième jour. Dans le cadre des expérimentations multi-générationnelle, un changement de sex-ratio a été observé à la troisième génération, en revanche dans le cadre des autres paramètres, le copépe semble se stabiliser à la troisième génération. Le copépe *E. affinis* semble donc s'adapter à son environnement.

The watershed of the Seine estuary is under high anthropogenic pressure resulting in high level of contamination. Despite the chemical and microbiological contamination copepod *E. affinis* represents 90% of the zooplankton biomass in the Seine estuary. The aim of this work was to develop a new larval bioassay (nauplius) based on the development (growth, chitobiase activity and survival) with the copepod *E. affinis* to assess its adaptation/acclimatization capacity face to chemical and microbiological contamination. At first, the bioassay was developed using sediments sorbed with representative molecules of estuarine contamination (AKPs, HAPS and PCBs) before being validated on natural sediment of the Seine estuary. Bioassay was applied in solution with 4 -NP and PCB 126 (respectively $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $200 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) under realistic environmental conditions and *Vibrio anguillarum* from the Seine estuary (10^1 and $10^6 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$). Finally, in parallel, multigenerational exposure was applied under the same conditions in order to observe the effects for three generations. The results recorded showed an effect on larval development during exposure to 4 -NP, PCB 126 and PAH after 6 days of exposure to sediment mixtures. In solution, similar results were obtained, with particular growth retardation after two days of exposure to 4 -NP and PCB 126. However, at the end of the experiment (after 6 days, this result is not observed). This result is correlated with chitobiase level activity and stages of development obtained every two days. During exposure to *Vibrio anguillarum*, an increase of chitobiase activity was recorded the first days of exposure, resulting in an increase of growth on the sixth day. In the context of multi-generational experimenting, changing sex ratio was observed in the third generation, however in the context of other parameters, the copepod appears to be stabilizing in the third generation. The copepod *E. affinis* seems to adapt to its environment.