



**HAL**  
open science

# Impact des polluants et du changement climatique sur les capacités de reproduction et le développement embryo larvaire de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arcachon

Perrine Gamain

► **To cite this version:**

Perrine Gamain. Impact des polluants et du changement climatique sur les capacités de reproduction et le développement embryo larvaire de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arcachon. Milieux et Changements globaux. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0011 . tel-01306578

**HAL Id: tel-01306578**

**<https://theses.hal.science/tel-01306578>**

Submitted on 25 Apr 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.

# THÈSE

PRÉSENTÉE À

**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DU VIVANT, GÉOSCIENCES, SCIENCES DE  
L'ENVIRONNEMENT

Par **Perrine GAMAIN**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : **Géochimie et Écotoxicologie**

IMPACT DES POLLUANTS ET DU CHANGEMENT CLIMATIQUE  
SUR LES CAPACITÉS DE REPRODUCTION ET LE  
DÉVELOPPEMENT EMBRYO LARVAIRE DE L'HUÎTRE CREUSE  
*CRASSOSTREA GIGAS* DANS LE BASSIN D'ARCACHON

Soutenue le : 15 février 2016

Devant la commission d'examen formée de :

Mme COSTIL Katherine	Maître de conférence, Université de Caen-Normandie	Rapporteur
Mr PICHEREAU Vianney	Professeur, Université de Bretagne occidentale	Rapporteur
Mme MOUNEYRAC Catherine	Professeur, Université Catholique de l'Ouest	Examineur
Mme BAUDRIMONT Magalie	Professeur, Université de Bordeaux	Présidente
Mr GEFFARD Olivier	Chargé de recherche, IRSTEA, Lyon	Examineur
Mr GONZALEZ Patrice	Chargé de recherche, Université de Bordeaux	Directeur de thèse
Mr CACHOT Jérôme	Professeur, Université de Bordeaux	Encadrant de thèse
Mme MORIN Bénédicte	Maître de conférence, Université de Bordeaux	Encadrant de thèse
Mme THEVAND Adeline	Ingénieur, SIBA	Membre invité
Mme LAMOUREUX Mélina	Chargée de mission, Agence de l'eau	Membre invité



## Remerciements

*La vie de laboratoire, au regard d'un œil non expérimenté, peut paraître froide et hostile, le cliché d'un environnement aseptisé en blouse blanche, masque et lunette de protection. Mais au-delà de cette apparence, la vie de laboratoire est remplie de rencontres, d'échanges, de complicité mais aussi de désaccords, de débats en tout genre autour d'un thé (ou d'un café pour beaucoup), de rire voire même de pleurs.*

*Dans un premier temps, je remercie très sincèrement le SIBA et l'Agence de l'eau Adour-Garonne et plus particulièrement Adeline Thévan, Mélina Lamouroux et Sabine Jeandenand pour leur soutien financier ayant permis de mener à bien ce projet. Merci également à l'ensemble des membres du jury qui ont accepté de juger ce travail de thèse. J'ai déjà eu la chance de pouvoir rencontrer certains d'entre vous, mais dans tous les cas je vous remercie tous de vous être déplacé et d'avoir pris de votre temps pour juger l'ensemble de ces travaux. Ce travail a été réalisé au sein de l'UMR EPOC et je tiens à en remercier les directeurs : Antoine Grémare, Thierry Corrège, Magalie Baudrimont. Merci également à l'école doctorale sciences et environnement et plus particulièrement à son directeur : Frédéric Garabétian.*

*Merci également à tous ceux qui ont contribué aux analyses : Pierre-Yves Gourves, Nicolas Mazzela, Karine Churlaud ainsi que Jean-Michel Escalier pour les problèmes d'ordinateurs !*

*Malgré l'absence de vacances, l'avantage de travailler sur les huîtres est de pouvoir aller sur l'eau en plein été, et de pouvoir dire, même si on est en maillot au milieu des bancs d'huîtres, que l'on est en train de travailler. Je tiens à remercier pour cela Francis, le marin de la Planula de la Station marine d'Arcachon, pour m'avoir amené sur les parcs, même à 4h du matin, toujours avec le sourire. Merci également à la Sepanso, et plus particulièrement à Dimitri, pour m'avoir ramené de l'eau pour les manip, mais aussi de m'avoir amené sur leur plate afin d'aller prélever les huîtres. J'y ai passé de très bons moments. Merci à l'équipe d'Ifremer d'avoir pris le relais quand les horaires ne collaient plus et de m'avoir conduit sur les parcs, avec des échanges enrichissants avec Danièle.*

*Durant ces trois années de thèse j'ai pu rencontrer des personnes formidables aux caractères complètement différents. Je tiens à remercier dans un premier temps Patrice, mon directeur de thèse de m'avoir confié ce sujet et soutenu autant scientifiquement que moralement. Avec Jérôme et Bénédicte, vous avez été, pendant ces trois années, une seconde famille à mes yeux, et malgré ma difficulté à l'exprimer, vous avez su, à votre manière être présents pour moi. Je pense pouvoir dire que grâce à vous tous, j'ai appris un peu plus à m'ouvrir et à exprimer ce que je ressens. En plus de l'enrichissement scientifique que vous m'avez apporté, j'ai apprécié votre côté humain et*

*vosre délicatesse envers moi, me demandant si je vais bien, si je tiens le coup. Merci à vous tous d'avoir apprivoisé mon côté sauvage. Merci aussi à Christelle, la fée du laboratoire. Il est vrai qu'au début, j'ai eu du mal à m'adapter à ton caractère très direct : je me souviendrai toujours du jour où tu m'as déposée toute ma vaisselle laissée dans l'étuve sur mon bureau, me demandant avec un petit mail « à la Christelle » de venir la ranger. Mais je peux le dire maintenant, tu représentes un modèle de personne dont je suis très admirative. Merci pour les échanges musicaux que nous avons eu, et pour toutes nos discussions, allant du dernier livre lu à l'épilation définitive. Tu as toujours été là quand j'avais besoin de toi, quand je t'appelais dans les couloirs ou venais à ton bureau. Merci aussi à Blandine, pour son côté maternel, ses bons légumes bio et pour notre gagaïtude vis-à-vis de nos chats d'amour ! Merci également d'avoir pris le temps de m'initier à l'histologie.*

*Je tiens également à remercier le groupe des doctorants qui se sont succédés au sein de cette petite équipe. Je parle ainsi de Florane, ou Floranne, on n'a jamais bien su, que je tiens à remercier pour sa gentillesse et son écoute durant ces premiers mois de thèse qui ont été compliqués pour moi. Tu es devenue une vraie amie et je te souhaite de réussir dans tous tes projets.*

*Merci également à Pauline, l'incroyable Pauline ! Comme on le dit souvent : tiens, tu as fait ta Pauline ! Toujours à 200 à l'heure, pleine d'énergie, chez qui on peut aller à n'importe quelle heure et qui sera toujours à l'écoute. Incroyable vu le débit de parole que tu as, mais tellement vrai. Je tiens à te remercier pour tout ton soutien dès ton arrivée au laboratoire, et merci également à Kouantig (pour une fois je l'ai peut-être bien écrit) de m'avoir supporté, mais que j'ai su (un peu) éduquer. Grâce à toi, je peux dire que l'on peut apprendre même des plus jeunes. Ma Linpo, merci pour tout...*

*Merci aussi à Bérenger, le plus loufouque des personnages que j'ai pu rencontrer pendant ces trois années, mais avec qui j'ai pu rire de tout et de rien.*

*La vie de laboratoire, c'est aussi rencontrer des gens de nationalité différentes, aux cultures différentes, avec qui ce fut un plaisir de pouvoir partager et débattre sur les modes de vie de chacun. Je pense alors à Khouloud, de qui j'ai beaucoup appris sur la culture Tunisienne et musulmane, et qui a eu le courage immense de quitter son mari pour la passion qui nous anime tous, celle de la recherche et plus particulièrement de l'écotoxicologie. Merci de m'avoir fait découvrir que j'aime les dattes Tunisienne ! Je pense aussi à Shannon, toi qui es l'incarnation de la sagesse. Ta gentillesse m'a beaucoup apaisée pendant ces années. De la même façon, tu fais preuve d'un grand courage en quittant ton pays pour quatre années. Mais tout comme tu as été là pour moi, je resterai là pour toi n'importe quand. Il faudra bien s'occuper de notre petit poisson Léon, le porteur de joie dans notre bureau des doctorants : les petits poissons dans l'eau, nagent nagent nagent, nagent,*

*nagent .... Merci également à Moulaye, qui m'a appris tellement sur la Mauritanie et sur la façon de faire face à ses sentiments. Je tiens à rajouter que dans ces différentes nationalités j'aurai pu t'inclure toi Pauline, la Bretonne invétérée, qui voit la Bretagne comme un pays à part entière, où l'on ne mange pas des chocolaines mais des pains au chocolat, long débat de nos pauses thé, entourée de toute cette équipe d'écotoxicologues aussi gourmands les uns que les autres. Car une des choses que je retiendrai de ces trois années de thèse : le chocolat c'est la vie... et je pense que la médaille d'or de la plus gourmande peut revenir à Christelle, qui a elle seule, entre plaquettes et chocolat chaud, participe grandement à la pénurie de cacao dans le monde. Le problème, quand on est thésard, est que le temps imparti à toute activité physique pour éliminer les calories devient très réduit...*

*J'ai également une pensée toute particulière pour tous les stagiaires qui sont passés au cours de ces trois années et qui m'ont marqué par leur folie, leur gentillesse, leur caractère pour certains, mais surtout pour le partage que nous avons eu tous ensemble. Merci Mélanie, Elio (mon super stagiaire), Le petit Louis, Jonathan, Tony, Tiaré (Tiaréééééééééééé), Téré, Mélisette, Clémence, Joséphine, Kevin (notre petit québécois), Giovanni, Alice, Perrine.*

*Je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe du LPTC. Mes débuts dans le monde de la chimie ont été quelque peu compliqués, mais finalement j'ai appris à trouver mes marques grâce à vous et toute l'équipe de doctorants ou techniciens tous aussi présents les uns que les autres.*

*Cette thèse je ne l'aurai pas faite sans le courage et la détermination que m'ont transmis mes parents. Je tiens à remercier mon père (et j'espère que de là où tu es tu pourras voir ça), qui m'a poussé dans cette direction, qui n'a pu assister à ces trois années, mais qui, je l'espère sera fier de moi. Cette thèse je la fais pour toi. Comme tu le disais, cette année c'est la plus importante ! Celle-ci en est une à nouveau. Merci aussi à ma petite maman, qui m'a soutenue, qui a tout fait pour que je tienne bon, me renvoyant au labo avec pour mot d'ordre : « les Gamain, ce sont des winners ». Sans vous, je n'en serai pas là où j'en suis aujourd'hui et je tiens à vous remercier du plus profond de mon cœur. Je tiens également à te remercier toi, Sébastien, de m'avoir toujours poussé vers le haut, de m'avoir consolé quand je rentrais épuisée après des journées de prélèvements ou de manip. Merci de m'avoir soutenu et de m'avoir accompagné dans cette aventure qu'est la thèse, je sais que cela a été difficile pour toi de supporter mon caractère et je l'écris ici : j'en suis désolée. Merci également à ta famille.*

*Je tiens également à remercier Allison, de m'avoir changé les idées et de m'avoir soutenue.*

*La recherche, si je devais la résumer, ce serait trois mots : entraide, échange, et folie.*



*A mes parents ....*





## Résumé

L'huître creuse du Pacifique constitue une part importante de la production aquacole mondiale, avec 555 913 tonnes produites en 2013. La France est le quatrième producteur mondial d'huîtres et *Crassostrea gigas* est la principale espèce cultivée dans le bassin d'Arcachon. Cependant, ces dernières années, des problèmes de recrutement et de captage des naissains de certaines cohortes d'huîtres sont survenus. L'augmentation de la fréquence de ces événements peut être révélatrice de changements dans la qualité du milieu. Dans ce contexte de crise, ces travaux se sont intéressés à l'impact de deux polluants, le cuivre et le S-métolachlore, majoritairement retrouvés dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryo-larvaire des larves D de l'huître creuse (24h post - fécondation). Dans un contexte de changement climatique, une approche multifactorielle a été adoptée afin d'étudier les effets combinés des polluants et de l'accroissement des températures ou des changements de salinité susceptibles d'altérer le développement et la survie des embryons et des larves en période estivale. Dans un premier temps, les effets embryo-toxiques d'une pollution par le cuivre ou le S-métolachlore couplés ou non à la salinité ou à différentes températures ont été étudiés sur des huîtres en provenance d'une écloserie. Pour cela le test embryo-larvaire a été utilisé, et ses limites d'application précisées. Dans un deuxième temps, les effets des polluants couplés ou non à des températures et salinités environnementales ont été analysés sur les embryons provenant d'huîtres sauvages ou cultivées prélevées directement dans le milieu en différents sites du Bassin d'Arcachon. Le pourcentage de malformations ainsi que l'expression différentielle de gènes cibles ont été déterminés chez les larves tandis que la bioaccumulation du cuivre et du S-métolachlore et le pourcentage d'occupation gonadique ont été analysés chez les géniteurs. Ces résultats ont ensuite été comparés afin de déterminer la capacité des huîtres d'écloserie à représenter un modèle alternatif aux huîtres autochtones. Dans l'objectif d'étudier les impacts liés au changement climatique, des conditions un peu plus extrêmes ont été testées, à savoir des températures supérieures de 26 °C, des salinités inférieures de 24 u.s.i et des concentrations en polluants supérieures aux conditions actuelles du bassin. La mise au point d'un logiciel d'analyse du comportement natatoire des larves D a également été réalisée. Nos résultats indiquent une bioaccumulation plus grande du Cu et S-métolachlore dans les huîtres cultivées par rapport aux huîtres sauvages. Par ailleurs cette étude indique clairement que les larves issues des huîtres autochtones (sauvages et cultivées) sont sensibles à des concentrations environnementales en cuivre et en S-métolachlore. Cependant, il a été montré que les gènes impliqués dans divers mécanismes de défense sont surexprimés, avec une plus grande capacité de défense des larves issues des huîtres sous l'influence des tributaires mais également des huîtres sauvages par rapport aux cultivées. En présence de concentrations environnementales de Cu comme de S-métolachlore, une augmentation des trajectoires erratiques circulaires a été constatée. De plus, les

larves, bien que capables de se développer normalement dans une gamme de températures allant de 22 °C à 26 °C, sont sensibles à l'action combinées des hautes/basses températures et des polluants. De la même manière, elles sont sensibles aux effets combinés de la dessalure et de l'exposition aux polluants. Les huîtres d'écloserie se sont révélées être une bonne alternative à l'utilisation des huîtres autochtones. Finalement, au vu des prédictions concernant l'évolution du climat, nos résultats indiquent qu'il faut s'attendre à un accroissement des malformations larvaires et donc à une diminution du recrutement des naissains dans les années futures dans le Bassin d'Arcachon.

**Mots-clés :** *Crassostrea gigas*, test embry-larvaire, polluants, changement climatique, température, salinité, analyse comportementale

## Abstract

The Pacific oyster represents an important part of the aquaculture production, with 555 913 tons produced in 2013. France is the fourth world producer of oysters and *Crassostrea gigas* is the principal cultivated species in the Arcachon bay. However, in recent years, problems of recruitment, capture and mortality of juvenile or adult oysters occurred. The increased frequency of these events can be indicative of changes in the global quality of the Arcachon bay. In this context of crisis, this work has been focused on the impact of two pollutants, copper and S-metolachlor, mostly found in the waters of the Arcachon bay, on D-larvae embryo-larval development of the Pacific oyster (24h post - fecundation). In a context of global climate change, a multifactorial approach was adopted to study the combined effects of pollutants and increase temperature or salinity changes that could affect the development and survival of embryos and larvae during reproduction season. First, the embryo-toxic effects of copper or S-metolachlor coupled to salinity or different temperatures were studied with oysters from hatchery. For this, the embryo-larval test was used, and its application limits specified. Secondly, the effects of pollutants combined or not to environmental temperature and salinity were analyzed on embryos from wild or cultivated oysters harvested directly on different sites of the Arcachon bay. The percentage of abnormalities and the differential expression levels of target genes were determined in larvae while the Cu and S-metolachlor bioaccumulation and the percentage of gonadal occupation were measured in genitors. These results were then compared to determine the ability of oyster from hatchery to represent an interesting alternative model to indigenous oysters. With the objective to study the impacts of climate change, somewhat more extreme conditions were tested, namely temperatures of 26 ° C, lower salinity of 24 u.s.i and higher concentrations of pollutants compared to current conditions in the lagoon. A software able to analyze swimming behavior of D-larvae was also developed. Our results indicate higher bioaccumulation of Cu and S-metolachlor in cultivated oysters compared to wild oysters. Furthermore this study clearly indicates that larvae from indigenous oysters (wild and cultivated) are sensitive to environmental concentrations of copper and S-metolachlor. However, it has been demonstrated that genes involved in various defense mechanisms are overexpressed with higher larval defense capacity of oysters under the influence of the tributaries but also wild oysters in comparison to cultivated oysters. In the presence of environmental concentrations of Cu or S-metolachlor, an increased erratic circular trajectory was found. In addition, larvae, although able to grow normally in a temperature range of 22 ° C to 26 ° C, are sensitive to the action of the combined high / low temperatures and pollutants. Similarly, they are sensitive to the combined effect of low salinity and exposure to pollutants. Oyster's hatchery have proved to be a good alternative to the use of indigenous oysters.

Finally, given the predictions of climate change, our results indicate that one can expect an increase in larval abnormalities and thus a decrease in the recruitment of spat in future years in the Arcachon bay.

**Mots-clés :** *Crassostrea gigas*, embryo-larval test, pollutants, climate change, temperature, salinity, comportemental analysis

**Title :** Impact of pollutants and climate change stressors on reproduction capacity and embryo-larval development of the oyster *Crassostrea gigas* in the Arcachon bay

# Table des matières

---

**Avant-propos**

**Valorisation scientifique**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures et des tableaux**

---

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>2</b>
1. Site d'étude .....	9
1.1. Présentation du Bassin d'Arcachon .....	9
1.1.1. Caractéristiques générales .....	9
1.1.2. Importance écologique : protection et surveillance. ....	11
1.1.3. Urbanisation .....	15
1.2. Activités économiques .....	16
1.....	16
1.2.1. Activité touristique .....	16
1.2.2. Activités professionnelles.....	16
1.3. Les crises dans le Bassin d'Arcachon .....	18
1.3.1. Contexte historique de l'ostréiculture arcachonnaise .....	18
1.3.2. Les autres espèces concernées .....	21
2. Modèle biologique .....	23
2.1. Présentation du modèle .....	23
2.2. Anatomie .....	26
2.3. Cycle de vie et de reproduction .....	28
2.3.1. La gamétogénèse.....	28
2.3.2. La ponte et la fécondation .....	29
2.3.3. Les stades larvaires.....	30
2.4. Les huîtres cultivées et les huîtres sauvages .....	32
2.5. Mode de production de l'huître .....	33
2.6. La variabilité de recrutement de l'huître creuse.....	34
2.6.1. Les programmes de recherche .....	34

2.6.2.	Facteurs de variabilité du recrutement.....	37
2.7.	Intérêt écotoxicologique de l'huître creuse japonaise <i>Crassostrea gigas</i> .....	41
3.	Contexte climatique .....	44
4.	Contexte de contamination : les polluants .....	52
4.1.	Les contaminants métalliques.....	53
4.1.1.	Généralité.....	53
4.1.2.	Le cuivre .....	55
4.2.	Les contaminants organiques de type pesticide .....	62
4.2.1.	Généralités .....	62
4.2.2.	Le métolachlore.....	67
5.	Les biomarqueurs.....	69
5.1.	Biomarqueur généraliste : examen histologique des gonades .....	69
5.2.	Biomarqueur à l'échelle cellulaire.....	70
5.2.1.	L'expression génique .....	70
5.2.2.	L'épigénétique.....	76
<b>Chapitre 2 - BASES MÉTHODOLOGIQUES .....</b>		<b>80</b>
1.	Huîtres d'écloseries vs huîtres natives du Bassin d'Arcachon.....	82
1.1.	Huîtres de l'écloserie de Guernesey.....	82
1.2.	Huîtres natives du Bassin d'Arcachon .....	84
1.2.1.	Populations sauvages vs huîtres cultivées .....	84
1.2.2.	Stratégie d'échantillonnage .....	84
2.	Paramètres étudiés .....	87
2.1.	Le test embryo larvaire.....	90
2.1.1.	Milieu d'essai.....	91
2.1.2.	Préparation des différentes conditions d'exposition : contamination au cuivre ou au métolachlore .....	91
2.1.3.	Obtention des gamètes .....	92
2.1.4.	Fécondation et ensemencement des œufs.....	93
2.1.5.	Incubation.....	94
2.1.6.	Analyses.....	94
2.2.	Test de toxicité sur spermatozoïdes et ovocytes .....	96
2.3.	Dosage des contaminants .....	97
2.3.1.	Le cuivre .....	97
2.3.2.	Le métolachlore.....	98

2.4.	Etude histologique de la gonade .....	103
2.4.1.	Réalisation de la coupe gonadique.....	103
2.4.2.	Fixation et déshydratation des tissus .....	103
2.4.3.	Réalisation des coupes .....	104
2.4.4.	Coloration et montage des coupes .....	104
2.4.5.	Mesures du pourcentage d'occupation gonadique .....	105
2.5.	Génétique.....	106
2.5.1.	Protocole d'obtention de larves en grande quantité .....	106
2.5.2.	Principe de la qRT-PCR en temps réel .....	107
2.6.	Epigénétique.....	113
3.	Développement d'un système d'analyse comportemental .....	114
4.	Statistiques .....	115
<b>Chapitre 3 - ANALYSE DES EFFETS COMBINÉS DE LA SALINITÉ, DU CUIVRE ET DU S-MÉTOLACHLORE SUR LE DÉVELOPPEMENT EMBRYO-LARVAIRE DE L'HUÎTRE CREUSE JAPONAISE.....</b>		<b>118</b>
1.	Essai préliminaire .....	120
2.	Article 1 : Effets combinés de la salinité et des polluants sur le développement embryolaire de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> dans le Bassin d'Arcachon .....	121
<b>Chapitre 4 - EFFETS COMBINÉS DES CHANGEMENTS DE TEMPÉRATURES, DU CUIVRE ET DU S-MÉTOLACHLORE SUR LE DÉVELOPPEMENT EMBRYO-LARVAIRE DE L'HUÎTRE CREUSE JAPONAISE.....</b>		<b>132</b>
1.	Essai préliminaire .....	134
2.	Article 2 : Effet combinés des températures et des polluants sur le développement embryolaire de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> . .....	138
3.	Données complémentaires .....	175
<b>Chapitre 5 - ANALYSE MULTIFACTORIELLE DE L'IMPACT DE LA POLLUTION DU BASSIN D'ARCACHON SUR LE DÉVELOPPEMENT EMBRYO-LARVAIRE DE L'HUÎTRE CREUSE JAPONAISE PRELEVÉE <i>IN SITU</i> .....</b>		<b>186</b>
1.	Article 3 : Effets des paramètres spatiaux ou du mode de vie des géniteurs d'huître, <i>Crassostrea gigas</i> originaire du Bassin d'Arcachon sur la sensibilité de leur descendance aux polluants.....	188
2.	Essai préliminaire .....	231
3.	Article 4 : Effets du cuivre et du S-métolachlore sur les capacités de fécondation et le développement embryolaire : étude des réponses génétique, histologique et toxicologique de l'huître creuse du Pacifique <i>Crassostrea gigas</i> .....	233



<b>Chapitre 6 - ANALYSE DE L'IMPACT DE CONDITIONS PRÉSENTES ET FUTURES DE TEMPÉRATURES, SALINITÉ ET DE CONCENTRATIONS EN CONTAMINANTS DANS LES EAUX DU BASSIN D'ARCACHON SUR LE DEVELOPPEMENT EMBRYO-LARVAIRE DE L'HUÎTRE CREUSE JAPONAISE.....</b>	<b>278</b>
1. Article 5 : Sensibilité des embryons de l'huître creuse Japonaise <i>Crassostrea gigas</i> exposés à des conditions environnementales présentes et futures. ....	280
<b>Chapitre 7 - ANALYSE COMPORTEMENTALE DES LARVES DE L'HUÎTRE CREUSE CRASSOSTREA GIGAS ISSUE DU BASSIN D'ARCACHON .....</b>	<b>312</b>
1. Acquisition des images .....	314
2. Traitement d'images .....	315
3. Traitement statistiques .....	317
4. Résultats .....	317
4.1. Température dans les micropuits.....	317
4.2. Dosage des polluants dans les eaux .....	317
4.3. Etude comportementale des larves D .....	318
4.3.1. Larves D issues des huîtres d'écloserie .....	318
4.3.2. Huîtres du Bassin d'Arcachon.....	322
4.4. Comparaison du comportement natatoire des larves issues des huîtres d'écloserie et d'Arcachon .....	326
5. Discussion .....	326
Conclusion .....	328
<b>Chapitre 8 - DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>330</b>
1. Robustesse et limite d'utilisation du test embryo-larvaire .....	332
2. Les huîtres de Guernesey en tant que proxy pour étudier la réponse des huîtres du Bassin d'Arcachon .....	334
3. Effets des polluants et des facteurs abiotiques : salinité et température .....	336
4. Réponse embryo-larvaires en fonction des paramètres in situ .....	340
<b>Chapitre 9 - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>344</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>348</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>.....</b>
ANNEXE 1.....	I
ANNEXE 2.....	XXI
ANNEXE 3.....	XXIII
ANNEXE 4.....	XXVII
ANNEXE 5.....	XXXI

## Avant-Propos

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du Programme OSQUAR 2 (Ostréiculture et qualité du milieu dans le Bassin d'Arcachon) soutenu par la région Aquitaine.

Elle a été financée par le Syndicat Mixte du Bassin d'Arcachon (S.I.B.A.) dans le cadre du Contrat Plan Etat – Région et par l'Agence de l'eau Adour-Garonne.

Cette étude a été labellisée par le laboratoire d'excellence Continental to coastal ecosystems: evolution, adaptability and governance (LabEx COTE).



## Valorisation scientifique

### Publications scientifiques

#### ✓ Publiées

Perrine Gamain, Patrice Gonzalez, Jérôme Cachot, Patrick Pardon, Nathalie Tapie, Pierre Yves Gourves, Hélène Budzinski, Bénédicte Morin, 2016. Combined effects of pollutants and salinity on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine environmental research* 113, 31-38

#### ✓ En préparation

- A proposer dans *Ecotoxicology* :

**Perrine Gamain**, Patrice Gonzalez, Jérôme Cachot, Hélène Budzinski, Nicolas Mazzella, Pierre Yves Gourves, Bénédicte Morin. Influence of the combined effects of temperature and pollutants on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

- A proposer dans *Environmental pollution* :

**Perrine Gamain**, Jérôme Cachot, Patrice Gonzalez, Pierre Yves Gourves, Hélène Budzinski, Bénédicte Morin. Do temporal and spatial parameters or lifestyle of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* broodstock native from the Arcachon Bay (Southwest coast of France) affect pollutant bioaccumulation, offspring development and tolerance to pollutants?

- A proposer :

**Perrine Gamain**, Patrice Gonzalez, Nicolas Mazzella, Guillemine Daffe, Jérôme Cachot, Bénédicte Morin. Effects of copper and S-metolachlor on fertilization success and D-larvae development of the Pacific oyster native from the Arcachon bay

A proposer dans *Chemosphere* :

**Perrine Gamain**, Patrice Gonzalez, Nicolas Mazella, Bénédicte Morin, Jérôme Cachot. Sensitivity of oyster embryos of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* to present and future environmental conditions

- A proposer dans *Environmental sciences and technologies* :

**Perrine Gamain**, Agnès Feurtet-Mazel, Régine Maury-Brachet, Isabelle Auby, Angel Belles, Hélène Budzinski, Guillemine Daffe, Patrice Gonzalez. Experimental ecotoxicological study of the impact of a cocktail of pesticides and copper on the seagrass *Zostera noltei* in the Arcachon bay

Congrès internationaux (communications orales)

Morin B., **Gamain P.**, Cachot J., Budzinski, H., Pardon P., Gourves, P.Y., Gonzalez P. Effects of copper, metolachlor and salinity on embryo-larval development of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* - PRIMO 18, Trondheim, Norvege. Mai 2015

**Gamain P.**, Gonzalez P., Cachot J., Budzinski H., Pardon P., Gourves P., Morin B. Sensitivity of Pacific oyster embryos (*Crassostrea gigas*) to combine effects of pollutants and salinity, SETAC Europe 25<sup>th</sup> Annual Meeting, Barcelone, Espagne. Mai 2015

**Gamain P.**, Gonzalez P., Cachot J., Budzinski H., Pardon P., Morin B. Impact of copper, metolachlor and changes in environmental parameters of the Arcachon Bay on embryo-larval development of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* - XIVth International Symposium on Oceanography of the Bay of Biscay , Bordeaux, France. Juin 2014

**Gamain P.**, Gonzalez P., Cachot J., Morin B. Impact of pollutants and climate change stressors on embryo-larval development of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the Arcachon Bay - SETAC Europe 24<sup>th</sup> Annual Meeting Bale, Suisse. Mai 2014

Congrès nationaux (communications orales)

**Gamain P.**, Gonzalez P., Cachot J., Budzinski H., Pardon P., Morin B. Impact des polluants et du changement climatique sur les capacités de reproduction et le développement embryolaire de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arcachon. SEFA, Bordeaux, France. Juin 2014

## Liste des abréviations

<b>A</b>	Adénine
<b>AcoA</b>	AcétylCoA
<b>Act</b>	$\beta$ actine
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>AMPA</b>	Acide aminométhylphosphonique
<b>ARCHYD</b>	Réseau hydrobiologique du Bassin d’Arcachon
<b>AFNOR</b>	Association française de normalisation
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ASCOBAR</b>	Apport scientifique à la problématique conchylicole du bassin d’Arcachon
<b>ATP</b>	Adénosine-triphosphate
<b>ATPase</b>	Adénosine-triphosphatase
<b>Bax</b>	Potéine X associé à Bcl2
<b>C</b>	Cytosine
<b>casp</b>	Caspase
<b>cat</b>	Catalase
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentration efficace médiane
<b>CERFACS</b>	Centre Européen de Recherche et de Formation Avancée en Calcul Scientifique
<b>CNRM</b>	Centre national de recherches météorologiques
<b>CNRS</b>	Centre national pour la recherche scientifique
<b>Cu</b>	Cuivre
<b>CL50</b>	Concentration létale médiane
<b>cox1</b>	Cytochrome-c-oxydase sous unité 1
<b>CRCAA</b>	Comité régional conchylicole Arcachon Aquitaine

<b>Cyp1A1</b>	Cytochrome P450 1A1
<b>DCPU</b>	Dichlorophényl urée
<b>DCPMU</b>	Dichlorophényl methyl urée
<b>DDTM</b>	Direction Départementale des Territoires et de la Mer
<b>DEA</b>	Atrazine-déséthyl
<b>DIA</b>	Atrazine-désisopropyl
<b>DMSA</b>	Acide dimercaptosuccinique
<b>DMST</b>	N, N-diméthyl-N'-p-tolylsulphamide
<b>DNase</b>	Désoxyribonucléase
<b>dNTP</b>	Désoxyribonucléotides tri-phosphate
<b>DT50</b>	Temps de demi-vie
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétraacétique
<b>Ef1-<math>\alpha</math></b>	Facteur d'élongation 1- $\alpha$
<b>ENE</b>	Eau néritique externe
<b>ENI</b>	Eau néritique interne
<b>ENM</b>	Eau néritique moyenne
<b>FAO</b>	Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
<b>FéliBa</b>	Fécondité des huîtres en lien avec la qualité de l'eau du Bassin d'Arcachon
<b>G</b>	Guanine
<b>GAME</b>	Groupe d'étude de l'atmosphère météorologique
<b>GIEC</b>	Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat
<b>GIZC</b>	Gestion intégrée des zones côtières
<b>Gpx</b>	Glutathion peroxydase
<b>Gst</b>	Glutathion -S-transférase
<b>HAP</b>	Hydrocarbure aromatique polycyclique
<b>HSP</b>	Heat Shock Protein
<b>ICP</b>	Inductively coupled plasma

<b>INERIS</b>	Institut national de l'environnement industriel et des risques
<b>INSEE</b>	Institut national de la statistique et des études économiques
<b>IRSTEA</b>	Institut de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture
<b>Koc</b>	Coefficient d'adsorption dans le sol
<b>LD</b>	Limite de détection
<b>LER-MPL</b>	Laboratoires environnement ressources Morbihan - Pays de la Loire
<b>LOEC</b>	Lowest observed effect concentration
<b>LQ</b>	Limite de quantification
<b>MESA</b>	Metolachlor ethane sulfonic acid
<b>MOA</b>	Metolachlor oxanilic acid
<b>MOREST</b>	Mortalités estivales
<b>MRM</b>	Multiple reaction monitoring
<b>MT</b>	Métallothionéine
<b>mt1</b>	Métallothionéine isoforme 1
<b>mt2</b>	Métallothionéine isoforme 2
<b>NADH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide hydrogène
<b>OSQUAR</b>	Ostréiculture et qualité du milieu : approche dynamique du Bassin d'Arcachon
<b>PCR</b>	Réaction en chaîne par polymérase
<b>PNEC</b>	Prédicte no effect concentration
<b>qRT-PCR</b>	Réaction de polymérisation en chaîne quantitative après rétrotranscription
<b>REBENT</b>	Réseau benthique
<b>REPAMO</b>	Réseau de pathologie des mollusques
<b>REPAR</b>	Réseau de Surveillance des Pesticides sur le Bassin d'Arcachon
<b>REPHY</b>	Réseau d'Observation et de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines
<b>RESCO</b>	Réseau d'observation conchylicole



<b>RIPOST</b>	Recherche interdisciplinaire sur la problématique ostréicole du Bassin d'Arcachon
<b>RNase</b>	Ribonucléase
<b>RNO</b>	Réseau national d'observation
<b>ROCCH</b>	Réseau d'observation de la contamination chimique
<b>rpl7</b>	Protéine ribosomique L7
<b>SAGE</b>	Schéma d'aménagement et de gestion des eaux
<b>SCOT</b>	Schéma de cohérence territoriale
<b>SPE</b>	Extraction en phase solide
<b>SIBA</b>	Syndicat intercommunal du Bassin d'Arcachon
<b>Sod</b>	Superoxyde dismutase
<b>SodMn</b>	Superoxyde dismutase mitochondriale
<b>SOMLIT</b>	Service d'observation en milieu littoral
<b>T°</b>	Température
<b>T</b>	Thymine
<b>TBT</b>	Tributylétain
<b>Tgl</b>	Triacylglycérol
<b>u.s.i</b>	Unité du système international
<b>VELYGER</b>	Observer, analyser et gérer
<b>Zn</b>	Zinc
<b>ZNIEFF</b>	Zone naturelle d'intérêt écologique, faunistique et floristique.

## Liste des figures

<i>Figure 1: Toponymie, situation géographique et passes internes et externes du Bassin d'Arcachon vues par le satellite SPOT (adapté de Le Berre et al., 2010 et Littaye et al., 2011).....</i>	<i>10</i>
<i>Figure 2: Mode de gestion des espaces naturels au sein du bassin d'ARCACHON (Littaye et al., 2011)11</i>	<i>11</i>
<i>Figure 3 : Localisation des activités agricoles au sein du Bassin d'Arcachon-Val de Leyre (Chambre de l'agriculture).....</i>	<i>17</i>
<i>Figure 4 : Principaux événements marquants de l'ostréiculture française et évolution de la production ostréicole française depuis 1900 pour les trois espèces d'huîtres cultivées en France (Buestel et al., 2009, Gouletquer et al., 1997, Bernard 2011).....</i>	<i>21</i>
<i>Figure 5 : Huître creuse adulte (FAO, 2013) .....</i>	<i>23</i>
<i>Figure 6 : Aire de répartition de l'huître creuse japonaise Crassostrea gigas (Miossec, 2009).....</i>	<i>24</i>
<i>Figure 7 : Recensement de la conchyliculture en France (issue de Agreste Primeur, 2014).....</i>	<i>25</i>
<i>Figure 8 : Schéma et photo de l'anatomie interne de l'huître creuse Crassostrea gigas (Issue de Miossec et al., 2009).....</i>	<i>27</i>
<i>Figure 9 : Cycle de développement de l'huître creuse Crassostrea gigas.....</i>	<i>31</i>
<i>Figure 10 : Récifs d'huîtres sauvages sur des parcs abandonnés en premier plan vs huîtres cultivées sur table en arrière-plan.....</i>	<i>32</i>
<i>Figure 11 : Transfert des naissains du Bassin d'Arcachon et les autres bassins de productions ostréicoles en France (adapté de Meresse et Frostin, 2012).....</i>	<i>34</i>
<i>Figure 12 : Facteurs influençant les différentes phases de vie de l'huître représentées en fonction de l'abondance et la durée des phases de reproduction (Bernard., 2011).....</i>	<i>37</i>
<i>Figure 13 : Relation entre Ln F/P et Ln M/P pour les 32 grandes cohortes larvaires définies entre 1985 et 2003 (F : larves en fixation, P : larves petites, M : larves moyennes) (Bernard, 2011) .....</i>	<i>39</i>
<i>Figure 14 : Évolution de 1860 à 2012 de la température annuelle moyenne à la surface de la Terre par rapport à la température moyenne de cette période prise comme référence, observée (courbe noire) en prenant en compte soit tous des facteurs externes connus (courbes oranges), soit uniquement les facteurs naturels (courbes bleues). Les principales éruptions volcaniques sont indiquées par les barres verticales (www.insu.cnrs.fr).....</i>	<i>46</i>
<i>Figure 15 : Evolution journalière de la température de l'eau dans le chenal du Teychan à la jetée d'Eyrac (les triangles correspondant aux minimas observés pendant la période 1988-2012) (Ifremer) .....</i>	<i>47</i>
<i>Figure 16 : Temps de renouvellement des eaux dans le Bassin d'Arcachon (Littaye et al., 2012) .....</i>	<i>49</i>
<i>Figure 17 : Voies d'entrée des contaminants dans les cellules (adpaté de Campbell et Reece, 2004)..</i>	<i>54</i>

<i>Figure 18: Concentrations en cuivre (mg.kg-1) dans les huîtres du Bassin d’Arcachon en trois points du Bassin d’Arcachon sur la période 1982 – 2014 (Ifremer, 2014).....</i>	<i>59</i>
<i>Figure 19 : Comparaison des médianes des concentrations en cuivre par point de prélèvement aux médianes nationales (représentées par la courbe) pour les cinq dernières années. Quatre classes ont été identifiées : la première, de 0 à 2 fois la médiane nationale, correspondant à des sites sans contamination particulière ; la dernière, plus de 6 fois la médiane nationale, correspondant à des sites particulièrement contaminés par le cuivre.....</i>	<i>60</i>
<i>Figure 20 : Substances actives arrivées en tête de classement SIRIS et quantité utilisée sur une année, par famille chimique au Bassin d’Arcachon (Dagens, 2012) .....</i>	<i>67</i>
<i>Figure 21 : Schéma représentatif des différentes étapes de la traduction (Jaspard 2013) .....</i>	<i>72</i>
<i>Figure 22 : Réponse au stress oxydant. Les abréviations SOD, CAT, GST, GR, et G6PDH représentent les enzymes superoxyde dismutase, catalase, glutathion S-transferase, glutathion réductase ; glutathion peroxydase et glucose-6-phosphate déshydrogénase respectivement (Hermes-Lima, 2004) .....</i>	<i>73</i>
<i>Figure 23 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale (adapté de Saraste, 1999) .....</i>	<i>74</i>
<i>Figure 24 : Les modifications épigénétiques représentées à travers les différents niveaux de condensation de la chromatine (issue de Nature 454, 711-715 (7 August 2008) .....</i>	<i>78</i>
<i>Figure 25 : Vue aérienne de l’écloserie de Guernesey .....</i>	<i>82</i>
<i>Figure 26 : Différentes étapes d’obtention des naissains puis des huîtres adultes. A- Les huîtres adultes sont maintenues à maturation dans une eau chaude puis mise à frayer. L’émission des semences peut être observée. B- Culture des micro-algues servant à la nutrition. C, D- Début de la culture des miro algues en petit béciers puis en grande structure externalisée. E, F- Les naissains obtenus sont transférés en bassin extérieur (issu du site <a href="http://www.guernseyseafarms.com/Oyster_Seed/Hatcheryprocess.html">http://www.guernseyseafarms.com/Oyster_Seed/Hatcheryprocess.html</a>) .....</i>	<i>83</i>
<i>Figure 27 : Conditionnement des huîtres de Guernesey. Les individus sont maintenus fermés à l’aide d’un élastique en caoutchouc. Un pain de glace permet le maintien d’une température fraîche pendant le transport par avion.....</i>	<i>83</i>
<i>Figure 28 : Carte du bassin d’Arcachon représentant les deux sites d’étude pour la période estivale 2013 .....</i>	<i>85</i>
<i>Figure 29 : Cartographie du pourcentage d’huîtres sans gonade développée à la fin du mois de juin. La flèche noire indique un gradient significatif au seuil de 5 % .....</i>	<i>85</i>
<i>Figure 30 : Carte du Bassin d’Arcachon représentant les deux sites d’études pour la période estivale 2014.....</i>	<i>86</i>
<i>Figure 31 : Relevés de salinité par la sonde SBE19 en trois points du Bassin d’Arcachon au cours de la période 2010-2014. En rouge, les minimums observés, en noir les maximums .....</i>	<i>88</i>
<i>Figure 32 : A et B – Illustration des bains de stimulation thermique. C- Isolement des individus en cours de fraie. D-Vérification en microscopie de l’obtention de gamète femelle .....</i>	<i>93</i>

<i>Figure 33 : Test embryo-larvaire sur huître creuse. A - Larve D témoin à T 24h ne portant aucun signe de malformation. B et C - Anomalie de la coquille : la charnière peut être concave ou bien convexe ou la coquille présenter une échancrure. D et F - Anomalie du manteau : Le manteau peut être rétracté entre les valves de la coquille voire hypertrophié, pouvant aller jusqu'à l'expulsion. F - Anomalie de segmentation : L'embryogénèse est alors bloquée. Observations au grossissement X200 .....</i>	<i>95</i>
<i>Figure 34 : Schéma des différentes étapes subit par l'échantillon par spectrométrie d'émission optique couplé à un plasma inductif .....</i>	<i>98</i>
<i>Figure 35 : Schéma de synthèse du développement de larves en grande quantité. Des contenants de 3L d'eau de mer ont été placés dans une salle maintenue à 24 °C. 500 000 embryons sont introduits dans chacune de ces bouteilles correspondant aux différentes conditions d'exposition : Témoin, 1 µg.L<sup>-1</sup> de cuivre, 100 ng .L<sup>-1</sup> de métolachlore.....</i>	<i>107</i>
<i>Figure 36 : Principales étapes de la rétro-transcription des ARNm en ADNc –Extraction des ARNm des larves D puis linéarisation de l'ARNm à 65°C. Hybridation des amorces oligodT et haxaprimers à 25°C . Synthèse du brin complémentaire d'ADNc monocaténaire après ajout de la RT et des désoxyribonucléotides (A,T,C,G) pendant 1h à 42 °C .....</i>	<i>110</i>
<i>Figure 37 : Courbe d'amplification obtenues par PCR (issu du site <a href="http://www.sigmaaldrich.com/">http://www.sigmaaldrich.com/</a> )</i>	<i>112</i>
<i>Figure 38 : Protocole de prélèvement des branchies et de la glande digestive sur les géniteurs .....</i>	<i>114</i>
<i>Figure 39 : Moyenne des mesures de pH (±écart type) pour chaque salinité de 18 à 33 u.s.i après dilution avec de l'eau ultra pure.....</i>	<i>120</i>
<i>Figure 40 : Pourcentage de saturation en oxygène dans les micropuits avant incubation (T0h) et à la fin de l'incubation (T24h) à différentes températures (20, 22, 24, 26, 28, 30 °C) en absence (A) ou en présence (B) de larves.....</i>	<i>135</i>
<i>Figure 41 : Pourcentage de saturation en oxygène dans les micropuits avant incubation (T0h) et à la fin de l'incubation (T24h) à 24 °C en présence de larves contaminées au cuivre (A) ou au métolachlore (B). .....</i>	<i>135</i>
<i>Figure 42 : Pourcentage de malformations larvaires en l'absence de contamination ou en présence de 2 µg.L<sup>-1</sup> de cuivre selon deux méthodes d'incubation A (Puits à 30 °C avant inoculation, inoculation puis incubation 24H à 30 °C) ou B (puits à température ambiante (24°C avant inoculation, inoculation puis incubation 24H à 30°C).....</i>	<i>136</i>
<i>Figure 43 : Pourcentage de malformations larvaires en conditions contrôles après exposition à différentes températures, des embryons d'huîtres sauvages des Jacques .....</i>	<i>176</i>
<i>Figure 44 : Pourcentage de malformations larvaires en conditions contrôles après exposition à différentes températures des embryons d'huîtres sauvages de Comprian .....</i>	<i>177</i>
<i>Figure 45 : Pourcentage de malformations larvaires en conditions contrôles après exposition à différentes températures des embryons d'huîtres cultivées des Jacques .....</i>	<i>178</i>
<i>Figure 46 : Pourcentage de malformations larvaires en conditions contrôles après exposition à différentes températures des embryons d'huîtres cultivées de Comprian .....</i>	<i>179</i>

<i>Figure 47 : Pourcentage des différentes malformations larvaires observées après exposition 24h à 24 °C au cuivre à différentes concentrations : A : 0 ; B :1 µg.L<sup>-1</sup>, C : 10 µg.L<sup>-1</sup> et D : 50 µg.L<sup>-1</sup> pour des larves issues des huîtres cultivées ou sauvages des Jacquets ou de Comprian .....</i>	180
<i>Figure 48 : Pourcentage des différentes malformations larvaires observées après exposition 24h à 24 °C au S-métolachlore à différentes concentrations : A : 0 ; B :10 ng.L<sup>-1</sup>, C : 100 ng.L<sup>-1</sup> et D : 1000 ng.L<sup>-1</sup> pour des larves issues des huîtres cultivées ou sauvages des Jacquets ou de Comprian .....</i>	181
<i>Figure 49 : Pourcentage d'occupation gonadique (%) pendant la période de reproduction pour les huîtres cultivées et sauvages provenant du Tès ou de Grand Banc en 2013, pour des géniteurs femelles (A) ou mâles (B). .....</i>	232
<i>Figure 50 : Observation des différentes trajectoires possibles effectuées par les larves (Logiciel ImageJ) .....</i>	316
<i>Figure 51 : Vitesses moyennes (Moyenne ± Erreur Standard) (µm.s<sup>-1</sup>) observées sur les larves D issues des huîtres d'écloserie, exposées à différentes concentrations en cuivre (A) ou en métolachlore (B). N = Nombres de larves étudiées .....</i>	319
<i>Figure 52 : Vitesses maximales (Moyenne ± Erreur Standard)(µm.s<sup>-1</sup>)observées sur les larves D issues des huîtres d'écloserie, exposées à différentes concentrations en cuivre (A) ou en métolachlore (B). N = Nombres de larves étudiées .....</i>	320
<i>Figure 53 : Pourcentage des trajectoires observées (Surplace, circulaire, rectiligne)(Moyenne ± Erreur standard) sur les larves D issues d'huîtres d'écloserie, exposées à différentes concentrations en cuivre (A) : 1 ou 10 µg.L<sup>-1</sup> ; ou en métolachlore (B) : 10 ou 100 ng.L<sup>-1</sup>. N : nombre de vidéos exploitées .....</i>	321
<i>Figure 54 : Vitesses moyennes (Moyenne ± Erreur Standard) (µm.s<sup>-1</sup>) des larves D issues des huîtres sauvages et cultivées du Bassin, exposées à différentes concentrations en cuivre (A) ou en métolachlore (B). N = Nombres de larves étudiées.....</i>	323
<i>Figure 55 : Vitesses maximales (Moyenne ± Erreur Standard) (µm.s<sup>-1</sup>) des larves D issues des huîtres sauvages et cultivées du Bassin, exposées à différentes concentrations en cuivre (A) ou en métolachlore (B). N = Nombres de larves étudiées.....</i>	324
<i>Figure 56 : Pourcentage des trois catégories de trajectoires (Surplace, circulaire, rectiligne)(Moyenne ± Erreur standard) suivies par les larves D issues des huîtres sauvages et cultivées, exposées à différentes concentrations en cuivre (A) : 1 ou 10 µg.L<sup>-1</sup> ; ou en métolachlore (B) : 10 ou 100 ng.L<sup>-1</sup>. N : nombre de vidéos exploitées. ....</i>	325
<i>Figure 57 : Pourcentage moyen (± écart-type) de malformations larvaires suite à l'exposition à différentes concentrations en cuivre (1,10 ou 50 µg.L<sup>-1</sup>) de onze couples de géniteurs différents .....</i>	332
<i>Figure 58 : Pourcentage moyen (± écart-type) de malformations larvaires suite à l'exposition à différentes concentrations en métolachlore (10,100 ou 1000 ng.L<sup>-1</sup>) de six couples de géniteurs différents .....</i>	333

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Position systématique de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> ( <a href="http://marbef.org/data">http://marbef.org/data</a> ) .....	24
Tableau 2 : Exemples d'études écotoxicologiques menées sur différents stades de l'huître .....	43
Tableau 3 : Exemples d'études écotoxicologiques menées sur les larves d'huîtres .....	44
Tableau 4 : Etudes écotoxicologiques de l'impact de la température couplé ou non à la salinité, au pH ou à la pCO <sub>2</sub> sur les stades larvaires de différentes espèces (*Effet au-delà ou en deçà de la température optimale de développement de l'espèce sauf indication) .....	51
Tableau 5 : Contamination en cuivre de différents sites dans le monde .....	58
Tableau 6 : Médianes des concentrations (mg.kg <sup>-1</sup> de poids sec) par rapport à la médiane nationale en différents points de relevés sur la côte Atlantique en France .....	61
Tableau 7 : Structure des pesticides fréquemment retrouvés dans les eaux du Bassin d'Arcachon .....	63
Tableau 7 (suite) : Structure des pesticides fréquemment retrouvés dans les eaux du Bassin d'Arcachon .....	64
Tableau 8 : Propriétés physiques et chimiques du métolachlore (adapté de Rivard, 2003) .....	68
Tableau 9 : Gènes étudiés et couples d'amorces utilisées lors de l'analyse génétique .....	71
Tableau 10 : Critères d'étude sur les huîtres natives du Bassin d'Arcachon au cours des deux campagnes de 2013 et 2014 .....	90
Tableau 11 : Schéma expérimental du test de toxicité des spermatozoïdes et des ovocytes .....	96
Tableau 12 : Limite de détection (LD) et limite de quantification (LQ) du métolachlore au cours des différentes dates d'injection .....	99
Tableau 13 : Limite de détection (LD) et limite de quantification (LQ) du protocole SPE pour chacun des composés dosés dans la matrice huître de la campagne 2013 .....	101
Tableau 14 : Limite de détection (LD) et limite de quantification (LQ) du protocole SPE pour chacun des composés dosés dans la matrice huître de la campagne 2014 .....	102
Tableau 15 : Les différentes étapes de coloration des tissus biologiques .....	105
Tableau 16 : Concentrations nominales et mesurées en cuivre dans l'eau de mer de référence et les différentes solutions de contamination au début du test embryo larvaire sur les huîtres d'écloserie .....	318
Tableau 17 : Concentrations nominales et mesurées en S-métolachlore dans l'eau de mer de référence et les différentes solutions de contamination au début du test embryo larvaire sur les huîtres d'écloserie .....	318

*Tableau 18 : Comparaison des vitesses maximales (Vmax), vitesses moyennes (Vmoy) et des trajectoires (Surplace, Circulaire, Rectiligne) pour les larves issues des huîtres d'écloserie ou du Bassin d'Arcachon..... 326*

---

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

---



## Introduction générale

Situé entre la terre et la mer, le Bassin d’Arcachon représente un patrimoine naturel exceptionnel du Sud-Ouest de la France à travers ses multiples richesses naturelles (dunes, forêt de pin, îlot de sable). Cette lagune accueille de multiples activités dont une grande majorité est tournée vers le milieu aquatique (pêche, cultures marines, activités balnéaires et de plaisance). Cependant, depuis quelques années, cette lagune vit dans un contexte de crise économique en lien avec les différentes crises ostréicoles. C’est pourquoi de nombreuses questions se sont posées, notamment quant à l’interaction d’un tel hydrosystème et de ses usagers. Cette thèse et les travaux qui la composent, s’emploient à étudier les effets de la pollution de la lagune mais aussi les effets du changement climatique sur une espèce économiquement et socialement majeure du Bassin d’Arcachon : l’huître creuse japonaise, *Crassostrea gigas*.

### **Le Bassin d’Arcachon, un écosystème lagunaire fragilisé.**

D’après l’organisation des Nations unies pour l’alimentation et l’agriculture (FAO), « les écosystèmes marins, dont dépendent les pêches, incluent les zones d’eaux côtières et de haute mer, les océans tropicaux et polaires, y compris quelques zones de mer semi-fermée ou fermée. Ils comprennent l’embouchure des bassins fluviaux et leurs panaches, baies, estuaires et lagunes, coraux et autres récifs, plateaux et talus continentaux, ainsi que leurs zones d’upwelling ». Ainsi, les lagunes, telles que le Bassin d’Arcachon, font partie des écosystèmes marins côtiers. Ces zones côtières sont des habitats essentiels pour de nombreuses espèces marines côtières et hauturières et représentent une grande richesse en terme de biodiversité. Elles concentrent à elles seules 25 % de la production primaire des océans, et 90 % de la pêche de poissons y est réalisée (Eisenreich et al., 2005). Ces zones fournissent ainsi une grande variété de ressources naturelles et de services écosystémiques qui sont exploités en permanence par les activités humaines. C’est une des raisons principales pour laquelle près de 40 à 50 % de la population humaine est concentrée dans un rayon de 100 km par rapport à la côte. Selon l’observatoire national de la mer et du littoral, en France en 2010, la population permanente des communes littorales métropolitaines était de 6,16 millions de personnes (ONML ; 2015). Cela représentait environ 9,3 % de la population totale sur environ 4 % du territoire. C’est pourquoi les zones côtières font l’objet de nombreuses études et outils visant leur protection comme par exemple la GIZC : Gestion Intégrée des Zones Côtières, outil de gouvernance pour un développement durable des zones côtières. Leur haute valeur écologique est également reconnue par la législation européenne via l’application de la directive Habitats et le réseau Natura 2000 (Loureiro et al., 2006). Cependant, les écosystèmes côtiers subissent un accroissement constant de la pression anthropique. La qualité des eaux côtières s’est d’autant plus dégradée au cours de ces dernières années que la population et les activités humaines ont augmenté (Newton et al., 2003). Ces zones sont devenues au fil des années

## Introduction générale

le réceptacle de nombreux contaminants générés par les activités humaines. D'après le Millennium Ecosystem Assessment ([www.maweb.org/](http://www.maweb.org/)), il est estimé que 60 % des écosystèmes côtiers dans le monde sont dégradés. Dans le Bassin d'Arcachon, de nombreuses activités liées à la mer comme la pêche ou encore l'aquaculture se sont développées. Ces activités sont intimement liées à la qualité des eaux de la lagune. Parmi celles-ci, l'ostréiculture est devenue l'activité économique dominante du Bassin d'Arcachon. Cette lagune réunit en effet des conditions environnementales propices au développement de l'huître creuse *Crassostrea gigas*, aussi bien en matière de température, de salinité ou encore de nutrition (Bijoux, 2014). Bien que ces conditions particulières soient réunies, le secteur ostréicole a dû faire face ces dernières années à de nombreuses crises. Cette activité historique a débuté dès le IV<sup>ème</sup> siècle par la pêche de l'huître plate *Ostrea edulis*, qui connut dans les années 20 une épizootie décimant une grande partie du stock d'huîtres, diminuant sa culture en faveur de celle de l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*, introduite accidentellement vers 1868. Entre 1967 et 1971, de nouvelles épizooties décimèrent les dernières huîtres autochtones et toutes les huîtres portugaises. Fut alors importée l'huître creuse *Crassostrea gigas* qui, aujourd'hui encore, demeure la seule huître élevée au sein du Bassin d'Arcachon. Cependant, assez rapidement, de nouvelles crises sont apparues. Dans les années 70, les ostréiculteurs ont fait face à une pollution anthropique liée à l'utilisation du tributylétain dans les peintures antifouling. Ces composés ont eu des conséquences sur la descendance et sur les huîtres adultes : absence de captage pendant cinq années consécutives de 1977 à 1981, problèmes de chambrage sur la coquille, amaigrissement (Bouchet et al., 1997). Vers 1980, les premières mortalités estivales d'huîtres ont été observées, atteignant à partir de 2008, des niveaux très élevés, impliquant des mortalités très importantes des naissains d'huîtres et des adultes d'où le nom de mortalités massives. En effet en 1998, la saison de reproduction a été caractérisée comme très atypique, avec un très faible niveau de captage. Au cours des années suivantes, l'intensité de captage a été très variable : bonne voire excellente en 1999, 2001, 2003, 2004, 2006, 2008 et de 2012 à 2014, moyenne en 2000, 2002, 2005, 2007 et de 2009 à 2011 (Auby et al., 2014). De multiples études ont été menées, à l'échelle du Bassin, et à plus large échelle afin de comprendre ces variabilités inter annuelles. Le programme MOREST (MORTalités ESTivales), dont l'objectif était d'avoir des réponses concrètes et applicables au problème des mortalités estivales de *Crassostrea gigas*, a proposé différents éléments explicatifs : lorsque les huîtres se retrouvent dans un environnement aux conditions trophiques riches, cela induit un épuisement physiologique de celles-ci suite à un effort de reproduction important, qui peut constituer un risque pour la survie au-delà d'une température de 19°C et sous condition de stress (Moal et al., 2010). Mais les mortalités massives de l'huître creuse ne touchent pas seulement le Bassin d'Arcachon. En effet, dans les régions du monde où elle est cultivée, cette espèce a dû faire face à des mortalités sans précédent. C'est le cas au Japon, dans la baie de Matsushima où depuis 1961 la culture de *Crassostrea gigas* a souffert de mortalités massives annuelles

## Introduction générale

récurrentes touchant plus de 50 % de la population (Mori, 1979). De tels évènements ont aussi été observés aux Etats Unis dans l'état de Washington (Perdue et al., 1981). La majeure partie des zones ostréicoles d'Europe de l'Ouest est aussi touchée, comme l'Allemagne où environ 60 % de mortalité a été observée en 2005 (Watermann et al., 2008). Aucune des classes de taille et donc des classes d'âge d'huîtres n'est épargnée, avec des taux de mortalité plus élevés pour les jeunes classes d'âge. En Irlande, depuis les années 1990, des mortalités estivales inexplicables ont eu lieu dans les populations de *Crassostrea gigas* et la production de cette espèce se trouve actuellement à un faible niveau au Pays de Galles (Cotter et al., 2010b). En France, en 2008, plusieurs pics de mortalités ont eu lieu sur la côte Atlantique : un premier pic fin mai-début juin assez faible (Bassin de Marennes-Oléron, Bretagne Sud), un deuxième, majeur, de fin juin à mi-juillet (Bassin de Marennes-Oléron, Bretagne Sud, Bretagne Nord et Normandie) et un troisième fin juillet-début août (majoritairement en Aquitaine) (Cochennec-Laureau and Baud, 2011). En 2010, dans le bassin Marennes Oléron, la baisse de commercialisation était estimée à 20 % (Mille and Le Moine, 2011). Cependant, non seulement la côte Atlantique se trouve concernée par ces crises, mais aussi la côte Méditerranéenne. Les huîtres cultivées dans les lagunes Méditerranéennes ont été sévèrement touchées en 2007 et 2008 (Pernet et al., 2010) avec pour la seule année 2008, environ 85% de mortalité sur le naissain (Pernet et al., 2011). Dans l'étang de Thau, les mortalités massives d'huîtres creuses sont liées à des infections par le virus Herpes OsHV-1 ou par la présence conjointe de ce virus et d'une bactérie : *Vibrio splendidus* (Pernet et al., 2010). Le phénomène de mortalité massive observé ces dernières années est souvent associé à la contamination par des agents infectieux. Mais il est aussi souvent lié à des changements environnementaux (changement de température, variation de salinité etc...) mettant en évidence l'équilibre fragile qui régit un écosystème. Cette fragilité s'est aussi fait ressentir sur d'autres espèces que les huîtres dans le Bassin d'Arcachon puisque les herbiers à zostères sont également impactés, leur surface régressant, notamment à l'intérieur de la baie. L'ensemble de ces crises, la dégradation ou, à plus long terme, la restauration des écosystèmes lagunaires sont des problématiques auxquelles de nombreux programmes tentent de trouver des réponses. Plusieurs hypothèses ont été évoquées pour expliquer les différentes crises ostréicoles : développement de maladies, réchauffement climatique, surpêche, affaiblissement génétique des huîtres du Bassin, manque de nourriture, absence de production de gamètes ou de pontes, etc. Cependant, les effets synergiques ou antagonistes de ces perturbations biotiques couplés aux perturbations abiotiques, telles que la pollution, n'ont été que peu envisagés, et représentent l'objectif principal de ce travail. Au cours de ce dernier, l'écotoxicité de deux grandes familles de polluants, les pesticides et les métaux, sera définie chez un des stades larvaires de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Pour cela, des concentrations d'exposition *in vivo* correspondant à celles retrouvées *in situ* seront testées, mais aussi des concentrations supérieures afin de discriminer au mieux les effets de ces polluants. Ces effets seront étudiés seuls ou en présence de deux facteurs

## Introduction générale

abiotiques sujets au changement climatique : la température et la salinité. Les deux polluants choisis : le cuivre et le S-métolachlore, ont un intérêt double pour le Bassin d’Arcachon, de part leur utilisation en activité agricole au niveau du bassin versant, mais aussi de par leur utilisation pour l’activité nautique, toutes deux économiquement importantes. Les expériences seront menées sur l’huître creuse *Crassostrea gigas* en provenance du Bassin d’Arcachon dû fait de son exposition fréquente aux polluants. Des huîtres en provenance de l’écloserie de Guernesey seront également utilisées. Au contraire des huîtres d’Arcachon, celle-ci sont élevées dans des conditions contrôlées. L’intérêt économique, sociétal et touristique de cette espèce est majoritaire au sein du bassin d’Arcachon. Elle sert également d’espèce d’intérêt dans les tests d’embryo-toxicité. Les effets embryo-toxiques de ces deux polluants, couplés ou non aux paramètres abiotiques, seront suivis grâce à l’étude microscopique des malformations larvaires. En période estivale, parallèlement aux malformations larvaires, la toxicité des polluants vis-à-vis des spermatozoïdes et des ovocytes sera étudiée. Une étude histologique sur les gonades d’huîtres sera conduite ainsi qu’une étude génétique. Enfin les effets embryotoxiques seront mis en relation avec une analyse comportementale des larves.

Afin de mener à bien cette étude, plusieurs objectifs ont été fixés :

1. Réaliser l’état des connaissances dans une synthèse bibliographique afin de contextualiser l’étude. Il intégrera une présentation de l’écosystème étudié, du modèle biologique d’intérêt et du contexte climatique. Le contexte de contamination sera détaillé, intégrant les deux polluants associés à notre approche expérimentale et l’état de l’art les concernant (**Chapitre 1**)
2. Exposer les méthodologies nous ayant permis de réaliser cette étude. Pour cela, un descriptif des deux provenances d’huîtres sera réalisé (huîtres d’écloserie ou huîtres du Bassin d’Arcachon) ainsi qu’un descriptif des stratégies d’échantillonnage en périodes estivales. Le protocole détaillé du test embryo-larvaire utilisé tout au long de cette étude sera réalisé, ainsi qu’une présentation des techniques de dosage des contaminants dans les eaux et dans les huîtres. Les méthodes complémentaires utilisées en période estivales seront également décrites (histologie, génétique, épigénétique). Une partie concernera la mise au point du logiciel d’analyse comportementale (**Chapitre 2**).
3. Evaluer les effets embryo-toxiques des variations en lien avec le changement climatique des deux paramètres abiotiques que sont la salinité et la température. Ces effets seront étudiés en présence ou non des deux polluants majoritairement présents dans les eaux du Bassin.

## Introduction générale

Pour ce faire, la contamination observée *in situ* de ces deux molécules dans les eaux du Bassin sera reproduite expérimentalement au cours du test embryo-larvaire, ainsi que des concentrations supérieures (**Chapitre 3 et 4**). L'objectif est de discriminer au mieux les possibles effets synergiques ou antagonistes de ces polluants en présence des paramètres biotiques. Les effets de la salinité ne seront étudiés que sur les huîtres d'écloserie. Parallèlement les limites d'application du test embryo-larvaire seront étudiées. Les effets des changements de température seront suivis sur des huîtres natives du Bassin d'Arcachon afin de déterminer si les géniteurs prélevés en différents points et ayant des modes de vie différents peuvent transmettre des adaptations à leur progéniture leur permettant de mieux résister au changement climatique. Cette étude portera également sur les huîtres d'écloserie afin de déterminer leur capacité à être un proxy des huîtres natives du Bassin face au changement climatique.

4. Evaluer les effets embryo-toxiques d'une pollution par le cuivre ou le S-métolachlore sur des huîtres sauvages et cultivées natives du Bassin d'Arcachon en fonction de différents paramètres (mode de vie, spatial, temporel). Pour ce faire, la contamination observée *in situ* de ces deux molécules dans les eaux du Bassin sera reproduite expérimentalement au cours du test embryo-larvaire. L'état de contamination des eaux et des huîtres natives du Bassin a également été suivie (**Chapitre 5**). L'objectif de ce chapitre est de déterminer si les paramètres temporel, spatial ou de mode de vie (sauvages ou cultivées) exercés sur les huîtres adultes peuvent influencer la résistance de leur progéniture à l'exposition à ces deux polluants. La détermination des possibles adaptations des huîtres adultes native du Bassin sera suivie à l'aide d'une étude de l'expression différentielle de différents gènes ainsi que la possible transmission à la descendance via l'étude des mécanismes épigénétiques.
5. La réponse de larves soumises à des conditions optimales, présentes (environnementales) ou à des conditions futures sera étudiée en couplant aussi bien les deux polluants que les paramètres salinité et température. L'objectif est d'émettre des hypothèses quant au devenir futur des larves en fonction des scénarios prévisionnels du GIEC face au changement climatique (**Chapitre 6**).
6. Mettre au point un logiciel d'analyse comportementale permettant de définir le comportement adopté par les larves en présence du cuivre et du S-métolachlore. L'objectif est de pouvoir utiliser un protocole d'utilisation simple, basé sur l'enregistrement de films courts,

## Introduction générale

permettant de définir quelques caractéristiques de nages des larves, telles que la vitesse moyenne, la vitesse maximale, les trajectoires adoptées (**Chapitre 7**).

7. Discuter et conclure autour de i) l'impact des polluants et du changement global sur les huîtres natives du Bassin, ii) la capacité des huîtres d'écloserie à représenter un bon modèle d'étude iii) les limites de réalisation en laboratoire du test embryo-larvaire et enfin iv) l'analyse comportementale (**Chapitre 8**).



---

## Chapitre 1 - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

---



## Chapitre 1. Synthèse bibliographique

Une synthèse bibliographique a été réalisée afin d'identifier l'état des connaissances, essentielles à la compréhension du sujet de notre recherche. Dans un premier temps le système lagunaire qu'est le Bassin d'Arcachon sera présenté, ainsi que le modèle biologique d'intérêt sur lequel repose l'ensemble de notre étude : l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Les connaissances concernant le contexte climatique et le contexte de contamination du Bassin d'Arcachon seront également développées, ces deux paramètres étant des points capitaux de notre étude.

### 1. Site d'étude

#### 1.1. Présentation du Bassin d'Arcachon

##### 1.1.1. Caractéristiques générales

Le Bassin d'Arcachon est une vaste étendue d'eau salée située dans le sud-ouest de la France, le long de la façade Atlantique. Dénommé lagune, il est séparé de la mer par la flèche sableuse du Cap Ferret, située à l'Ouest, et communique avec l'océan Atlantique par l'intermédiaire de deux passes étroites (Figure 1). Cette communication entre océan et lagune permet, par le biais des marées de type semi diurne, auxquelles est soumis le Bassin, de renouveler les eaux de la lagune deux fois par jour. Le marnage peut varier de 0,90 m pour une marée de faible amplitude, dite de morte eau, à 4,90 m pour une marée de forte amplitude, dite de vive eau (Blanchet, 2004). La superficie totale de la lagune est d'environ 180 km<sup>2</sup> (18 232 ha), à marée haute, passes comprises. Quelques 110 km<sup>2</sup> émergent lors des basses mers (Bouchet et al., 1997; Le Berre et al., 2010 ; SMVM, 2004) soit quasiment les deux tiers de la surface totale du Bassin, définissant la zone intertidale. La zone subtidale est constituée par les chenaux (47 km<sup>2</sup>) et les passes (24 km<sup>2</sup>).

Dans la lagune, le volume d'eau contenu (passes non comprises) en basse mer de vives eaux a été estimé à 270 millions de m<sup>3</sup>. Lors des pleines mers moyennes, le volume d'eau est de l'ordre de 460 millions de m<sup>3</sup>. Au niveau des passes, le volume d'eau oscillant est compris, pour des marées de vive eau, entre 370 et 400 millions de m<sup>3</sup> contre 130 à 200 millions de m<sup>3</sup> en période de mortes eaux (Auby, 1991). La composante océanique, à travers l'influence de la marée, est donc fortement marquée au sein de la lagune. Mais celle-ci est également soumise à des apports d'eaux douces estimés à environ 3,45 millions de m<sup>3</sup> par jour (Bouchet et al., 1997) ce qui reste faible au regard des volumes d'eaux

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

océaniques transitant à chaque marée entre l'océan et la lagune. Ces apports sont dûs pour 79 % aux cours d'eau, dont la Leyre qui participe pour 4/5ème des apports, aidée ensuite par le canal de Lège au Nord et le canal des Landes au Sud du Bassin (Figure 2). Le reste est apporté par les pluies à hauteur de 13 % et la nappe phréatique pour environ 8 % (Bouchet et al., 1997).

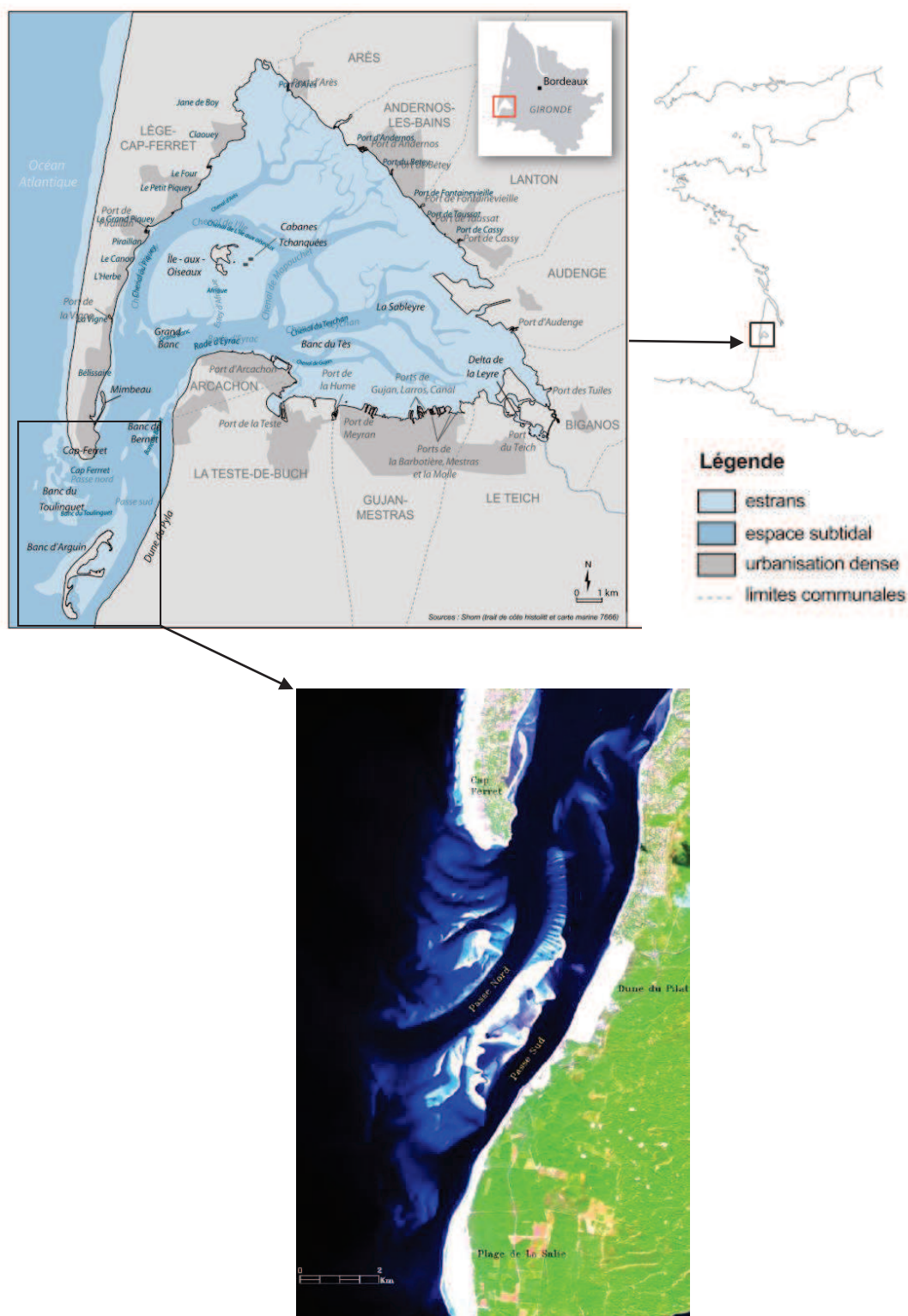


Figure 1: Toponymie, situation géographique et passes internes et externes du Bassin d'Arcachon vues par le satellite SPOT (adapté de Le Berre et al., 2010 et Littaye et al., 2011)



## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

sédentaires) ou temporaire (migrateurs). Il est géré avec l'aide technique du Parc Naturel Régional des Landes de Gascogne.

Deux réserves naturelles nationales ont aussi vu le jour : celle du Banc d'Arguin en 1972 et des prés salés d'Arès et Lège Cap Ferret en 1983. Sont aussi présents dix sites du Conservatoire du littoral, trois réserves de chasse maritime, deux réserves de pêche et deux sites Natura 2000, au titre de la directive « Habitats, faune flore » et de la directive « Oiseaux » (Littaye et al., 2011). L'ensemble de ces outils de gestion sont représentés sur la figure 2. La protection du Bassin a été complétée en octobre 2013 par la création d'un Parc Naturel Marin (PNM). Cet outil de gestion consiste en trois grands objectifs : l'amélioration des connaissances du milieu, la protection de l'écosystème et le développement durable des activités liés à la mer (Littaye et al., 2011).

A travers toutes ces particularités, on peut comprendre pourquoi de nombreuses espèces (poissons, crustacés, céphalopodes) viennent se reproduire dans le Bassin, qui joue un rôle de nurserie. D'autres y trouvent l'alimentation nécessaire à leur bon développement et à leur survie (Le Berre et al., 2010). Mais l'ensemble de ces fonctions ne pourrait exister sans la présence remarquable des herbiers à zostères qui constituent des éléments très importants pour l'équilibre écologique du milieu. Le bassin d'Arcachon abrite le plus grand herbier à zostères naines (*Zostera noltei*) d'Europe. Cette espèce colonise les zones intertidales alors que sur les cuvettes intertidales et les bords des chenaux est rencontrée la zostère marine (*Zostera marina*). L'intérêt de ces herbiers est multiple : écologique et patrimonial, paysager sous-marin, scientifique mais aussi économique (Auby et al., 2010), de par leur rôle en tant que zone de nurserie, de nourricerie, de frai, de protection contre les prédateurs, et de protection des sédiments contre l'érosion (Ganthy, 2011).

Cependant un déclin important de 33% (soit 22,8 km<sup>2</sup>) des herbiers de zostère naine a été observé entre 1988 et 2008, et de 74% (2,7 km<sup>2</sup>) des herbiers à zostère marine (Plus et al., 2010), suggérant une modification dans la qualité du milieu potentiellement lié à la présence dans les eaux du Bassin, de pesticides couplé à une augmentation des températures (Gamain et al., 2016a).

Face à cette richesse écologique et aux menaces qui pèsent sur le Bassin, depuis 1974, différents programmes ont été initiés et se succèdent, afin de comprendre le fonctionnement d'un tel hydrosystème, de le surveiller et de le protéger.

En 2008, le **ROCCH**, Réseau d'Observation de la Contamination Chimique, a succédé au **RNO** (Réseau National d'Observation) créé en 1974 pour la surveillance de la pollution des eaux côtières. Il permet la surveillance de trois métaux réglementés (cadmium, plomb et mercure), les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (benzo(a)pyrène), et enfin les dioxines et PCB (PolyChloroBiphényles) de

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

type dioxine (PCBdl) dans les mollusques du littoral : les huîtres et les moules. Les données du ROCCH sont archivées dans la base Quadrigé<sup>2</sup> de l'Ifremer. D'autres métaux non réglementés sont dosés à l'initiative de l'IFREMER (Zn, Cu, Ag, Ni, Cr) (Marchand et al., 2015).

En 1984 fut créé par l'Ifremer le Réseau d'Observation et de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines : le **REPHY**. Ce réseau réalise une observation des espèces phytoplanctoniques et détecte les espèces toxiques et nuisibles notamment par la recherche de phycotoxines dans les coquillages potentiellement dangereux pour le consommateur. Un suivi physico chimique du milieu est aussi réalisé afin d'analyser la température de l'eau, la salinité, la turbidité, l'oxygène et les nutriments (Belin and Neaud-Masson, 2012).

Depuis 1988, cette surveillance physico chimique de l'eau s'est accrue avec 8 stations réparties sur l'ensemble de la baie soumises à un suivi hydrologique hebdomadaire par le réseau HYDrobiologique du Bassin d'ARCAchon : **ARCHYD**. Différents paramètres physico-chimiques et biologiques sont suivis (température, salinité, matière en suspension, silicate, nitrate, ammonium, phosphate, chlorophylle a) afin de déterminer les caractéristiques spatio-temporelles des différents secteurs et de mettre en évidence des tendances. Il permet ainsi la constitution d'une base de données élémentaires (ARCHYD, 2015).

Un an plus tard, en 1989, le Réseau de contrôle Microbiologique REMI est mis en place par l'Ifremer puis révisé en 1997. L'objectif de ce réseau était d'opérer une surveillance microbiologique des mollusques des zones de productions conchylicoles. S'ensuit un classement des zones de production de coquillages reflétant la qualité sanitaire des zones par dénombrement de *Escherichia coli* dans les coquillages, un marqueur de contamination fécale (Piquet, 2014).

La surveillance au niveau des mollusques s'est encore accrue en 1992 avec la création du Réseau de pathologie des mollusques **REPAMO**, créé pour surveiller l'état de santé des mollusques. Pour cela un suivi zoosanitaire des populations conchylicoles est réalisé, l'objectif étant de maintenir leur production en prévenant l'introduction d'animaux infectés et en détectant aussi rapidement que possible un nouvel agent pathogène afin de limiter sa propagation. En 2009, ce réseau est remplacé par le réseau d'observation conchylicole : **RESCO**, qui prend place au sein du programme « Aquaculture durable ». Par des suivis à fréquence élevée, des données de croissance, de survie et de reproduction sont acquises annuellement pour des lots d'huîtres *Crassostrea gigas*. La coordination du réseau est assurée par le LER-MPL (Laboratoires Environnement Ressources Morbihan - Pays de la Loire) (Cochennec-laureau, 2015).

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

Pour compléter les analyses quant à la qualité physico-chimique de l'eau, le réseau national du **SOMLIT** (Service d'Observation du Milieu LITtoral), créé en 1995, réalise des prélèvements en trois points du Bassin, allant de l'ouverture vers l'océan « Bouée 13 », à la jetée d'Eyrac face à Arcachon, jusqu'à Comprian, situé plus en interne. Les informations recueillies tentent de répondre à la problématique du changement global sur les zones côtières et son importance relative par rapport aux activités humaines locales, à travers un suivi long terme de différents facteurs (température, pH, salinité, nitrates, nitrites, etc) et par l'extraction de tendances saisonnières et interannuelles (SOMLIT, 2015).

De multiples réseaux assurent ainsi la surveillance de la qualité physico-chimique mais aussi biologique de l'eau du bassin. Des analyses dans les mollusques sont aussi réalisées mais il est apparu un manque de suivi à plus grande échelle de la faune et de la flore composants le Bassin. Ainsi en 2003 fut instauré le **REBENT**, le Réseau Benthique, permettant de recueillir des données relatives à la distribution des habitats côtiers et au suivi de leur biodiversité faunistique et floristique et d'établir un état des lieux afin de détecter les évolutions spatio-temporelles (Ifremer, 2014).

Plus récemment, en 2010, suite au constat alarmant concernant la régression des herbiers de zostères et aux mortalités inexplicables d'huîtres, le Réseau de Surveillance des Pesticides sur le Bassin d'Arcachon **REPAR** a été développé. Il prend place au sein du plan national EcoPhyto 2018. Ses objectifs sont de quantifier la présence des pesticides dans les eaux du Bassin et de comprendre leurs effets sur l'environnement aquatique, mais aussi de connaître les usages et usagers de ces substances afin de cerner les évolutions futures possibles. Plusieurs acteurs sont présents dans ce réseau : le SIBA (Syndicat Intercommunal du Bassin d'Arcachon) dont les équipes gèrent ce réseau, l'Ifremer, l'Agence de l'Eau, l'IRSTEA, le Ministère de l'Agriculture, l'Université de Bordeaux mais aussi, depuis 2014, le Conseil Général de la Gironde, le SAGE "Leyre et cours d'eau côtiers" et le SAGE "Lacs Médocains" (Dagens, 2012).

Finalement, le suivi de la contamination du Bassin d'Arcachon a révélé la présence actuelle de nombreuses molécules phytosanitaires (retrouvées notamment dans les cours d'eau) avec une prépondérance des métabolites du métolachlore et de l'alachlore. Le cuivre est un contaminant dont les concentrations progressent fortement dans le bassin d'Arcachon, notamment sur les sites à l'intérieur du bassin d'Arcachon, comme Comprian. La contamination métallique des huîtres est proche de la médiane nationale pour le cadmium le plomb et le mercure, à l'exception de Comprian où la teneur en cadmium est plus élevée. La tendance de la contamination est stable ou décroissante à l'entrée du Bassin (Cap Ferret) mais croissante dans le fond de la Baie pour le plomb (Les Jacquets et Comprian) et pour le cadmium (Comprian). Les concentrations en HAP augmentent depuis une dizaine d'années, particulièrement dans les zones internes (Comprian, Les Jacquets). Une contamination

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

particulièrement faible pour les polychlorobiphényles est observée. Les concentrations en dichlorodiphényl-trichloroéthane ont été divisées par 50 en 15 ans. La salinité du Bassin n'a pas évolué de façon générale, bien que quelques événements extrêmes mais exceptionnels se soient produits ces dernières années (salinité de 8 u.s.i au niveau de Compiègne au cours de l'hiver 2013). Depuis 1987, une tendance à l'augmentation des températures de l'air et de l'eau est observée avec une augmentation respective de 1,7 °C et 1,3 °C. Depuis cette même date a été constatée une diminution des précipitations (-11 mm) et des débits fluviaux ( $-7 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ), ainsi qu'une augmentation de l'irradiation solaire, de la force des vents ( $+ 6 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et de la quantité de nitrates ( $+ 3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Enfin alors qu'aucune modification dans la concentration en chlorophylle n'a été mesurée, une évolution du pool nutritif au profit de taxa à faible qualité nutritive a été observée.

**Avec un climat agréable de type tempéré océanique (Bouchet et al., 1997, SMVM, 2004) et un environnement très diversifié et protégé, le Bassin présente des conditions optimales de vie et de développement de nombreuses activités tant professionnelles que touristiques.**

### 1.1.3. Urbanisation

Avec 63 286 habitants sur la communauté d'agglomération du Bassin d'Arcachon Sud et 60 413 habitants sur la communauté d'agglomération du Bassin Nord en 2012, le Bassin d'Arcachon ne cesse de s'accroître au niveau de sa population (INSEE, 2013). En dix ans, c'est une augmentation de 17,9 % du nombre d'habitants qui s'est faite ressentir. Cependant, il faut noter que le taux de résidence secondaire y est relativement important puisque ce sont près de 40% qui ont été recensées sur l'ensemble des communes du Bassin (Peyrefitte, 1993). Ceci peut être expliqué par l'attractivité du milieu en période estivale. En effet, comme nous l'avons dit précédemment, le climat y est agréable et l'environnement très diversifié et remarquable. Le Bassin rentre donc dans la catégorie des stations balnéaires phares des vacanciers, si bien que la population se voit multipliée jusqu'à plus de trois dans certaines communes (Le Berre et al., 2010). Une des conséquences majeures de cet engouement réside dans le fait que le Bassin, pour des raisons climatiques, géographiques et paysagères, est devenu un des sites majeurs de la navigation de plaisance en France (Le Berre et al., 2010).

L'ensemble des dix communes riveraines du Bassin d'Arcachon doit collecter et traiter avant rejet les effluents des 110 000 habitants permanents. L'assainissement constitue ainsi une priorité environnementale. Pour cela un réseau de collecte achemine les eaux usées vers 3 stations d'épuration (La Teste de Buch, Biganos, Cazaux) d'une capacité totale de 290 000 équivalents habitants. 30 000 m<sup>3</sup> d'effluents sont ainsi traités chaque jour avant leur rejet en mer, soit plus de 11 millions de m<sup>3</sup>/an (SIBA, 2013).

## 1.2. Activités économiques

### 1.2.1. Activité touristique

Le nautisme est l'activité de loisirs prédominante du Bassin. L'étude de LeBerre et al. en 2010 a permis d'estimer quantitativement l'importance de la fréquentation nautique : 11 869 embarcations dont 567 bateaux professionnels (liés aux activités de pêche et d'ostréiculture) et 11 302 bateaux de plaisanciers dont 75,6 % d'embarcations de plaisance motorisés. Par ailleurs on dénombre 235 716 plaisanciers naviguant aux abords du Banc d'Arguin sur les deux mois d'été (juillet et août). Le Bassin étant un milieu confiné, une très forte concentration des activités de plaisance sont concentrées à l'intérieur du bassin, les touristes ne s'aventurant pas à franchir les passes. Peuvent alors se poser des questions quant à l'interaction des usagers et de l'environnement. En effet, l'entretien des bateaux passe par un entretien de la coque et plus particulièrement de la carène, partie immergée du bateau. Cet entretien, dénommé carénage fait appel à des méthodes classiques de grattage des organismes fixés ou plus couramment par l'emploi de produits appelés antifouling pouvant alors se retrouver dans les eaux du Bassin. C'est cette problématique que nous traiterons dans la partie bibliographique consacrée aux polluants.

### 1.2.2. Activités professionnelles

Trois grandes classes d'activités professionnelles sont représentées au niveau du Bassin d'Arcachon : l'activité agricole au niveau du Bassin versant, une activité industrielle et militaire aux abords du Bassin et des activités internes au Bassin touchant aux produits de la mer.

#### **Activités agricoles**

La majeure partie des données citées ici provient du diagnostic agricole du SCOT (Schéma de Cohérence Territoriale) de 2012. L'agriculture est peu présente sur l'ensemble du bassin versant puisqu'elle ne représente que 6 % du territoire SCOT (Brunel et al., 2013). Mais avec 1200 emplois directs en 2012 cette profession représente un poids économique non négligeable. Les activités de production sont fortement diversifiées avec deux grandes filières : l'élevage et la culture.

La filière élevage concerne le bétail, les gibiers et les volailles mais n'est que faiblement représentée puisque 95 % des surfaces agricoles du territoire sont constituées de grandes cultures. La maïsiculture prédomine occupant 65 % de l'espace. Le reste est constitué de production de céréales (blé, orge, avoine), de légumes et féculents (carottes, pomme de terre, haricots verts ...), d'herbes aromatiques ou encore de productions horticole et florale avec les pépinières (Figure 3).



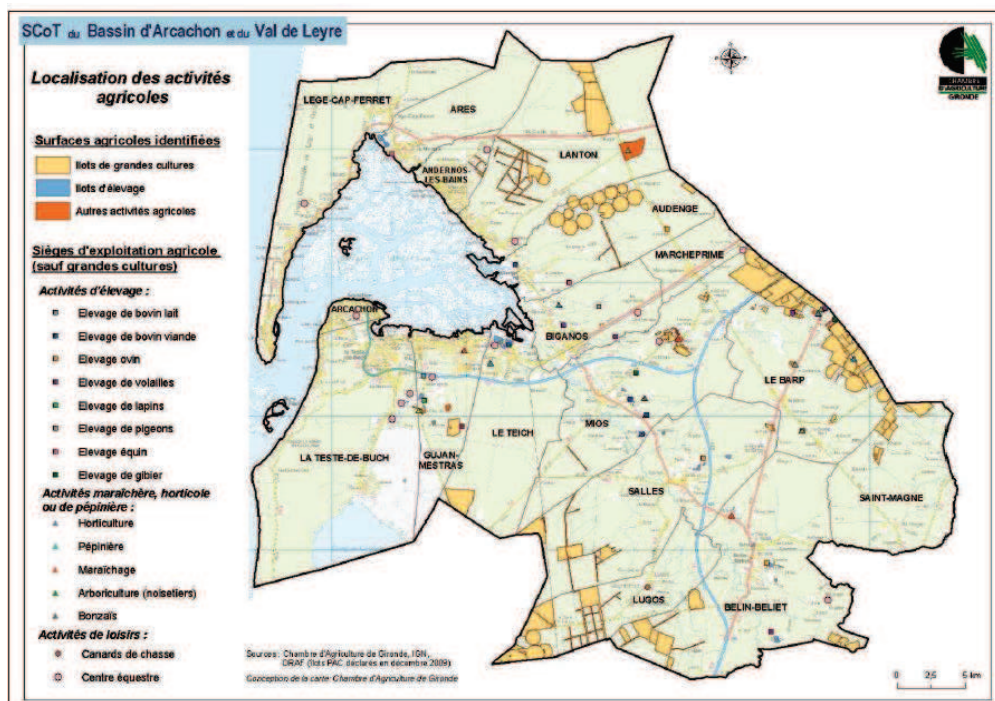


Figure 3 : Localisation des activités agricoles au sein du Bassin d'Arcachon-Val de Leyre (Chambre de l'agriculture)

Cependant, l'agriculture représente une activité anthropique. A ce titre, elle peut influencer la qualité du milieu. Située essentiellement au niveau du Bassin versant du Bassin d'Arcachon, l'ensemble des produits phytosanitaires utilisés pour le maintien et l'amélioration des rendements des cultures peut se retrouver, *in fine*, dans les eaux du Bassin d'Arcachon. Les pesticides proviennent à 95 % des usages agricoles. Les usages urbains et domestiques représentent 5 % des usages restant, mais ils représentent 30 % des apports (Adour-Garonne, 2013). Ce mode de transfert sera étudié dans le chapitre concernant les polluants et plus particulièrement les pesticides.

### Activités industrielles et militaires

Le Bassin d'Arcachon est une zone faiblement industrialisée avec principalement trois grands secteurs : la construction navale, la papeterie de SMURFIT à Biganos et le BTP (Bâtiment travaux publics).

S'est aussi développée une activité d'extraction pétrolière productive, d'environ 1500 m<sup>3</sup> par jour (Crespo, 2009) au niveau d'Arcachon, du Courbey, du Pyla et de la Teste de Buch. Des puits sont aussi présents au niveau de Cazaux, commune de la Teste. En effet, cette source de pétrole au niveau de Cazaux avait été découverte près d'un demi-siècle plus tôt par Esso. De nos jours, la société canadienne Vermillon, y extrait en moyenne 1 150 barils (environ 184 000 litres) par jour, à partir de 47 puits actifs. C'est environ le quart de la production en aquitaine et 13 % de la production française. C'est cette société qui exploite actuellement les différents sites du Bassin.

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

Dans cette même commune de Cazaux est située la Base Aérienne 120 "Commandant Marzac » depuis 1962. C'est une source d'emploi puisque près de 3000 personnes travaillent sur le site (<http://www.ba120.air.defense.gouv.fr/>). Depuis 2014, la base aérienne de Cazaux s'est engagée dans une démarche de protection de la nappe phréatique et de diminution de la pollution atmosphérique en rénovant son aire à feu.

### Activités d'exploitation des produits de la mer

De par sa grande richesse faunistique, de nombreuses activités d'exploitation des ressources vivantes marines se sont développées telle que la pêche, aussi bien océane qu'en intra bassin. Le tonnage des captures totales déclarées (entre 1998 et 2003) varie, selon les années, entre 500 et 750 tonnes par an (IFREMER, 2015). Parmi ces captures, celles des mollusques bivalves (palourdes, moules et coques) et céphalopodes (seiches) restent majoritaires.

L'activité de conchyliculture représente une part importante de l'économie locale, principalement grâce à l'activité ostréicole de l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas*. Cette espèce a une valeur économique importante au sein du Bassin, avec une grande part liée à la vente de naissains qui représente 25 % du chiffre d'affaire annuel de l'activité ostréicole (Auby et al., 2014). Cependant, ces dernières années, de nombreuses crises ostréicoles ont eu lieu au sein du Bassin. Elles concernent la mortalité des huîtres adultes et des juvéniles, la salubrité des huîtres, les nombreuses interdictions de vente, les mauvaises années de captage ou encore les fluctuations en termes de production de plus en plus fréquentes sur la dernière décennie.

### 1.3. Les crises dans le Bassin d'Arcachon

Bien que regroupant des conditions de vies favorables, le Bassin d'Arcachon a rencontré depuis quelques années des périodes de crises dont celle majoritairement reconnue car économiquement et socialement problématique, la crise ostréicole (Figure 4). Mais l'huître n'est pas la seule espèce concernée par ces crises.

#### 1.3.1. Contexte historique de l'ostréiculture arcachonnaise

Tout commence avec l'huître plate *Ostrea edulis*, ou gravette, pêchée dès le IV<sup>ème</sup> siècle. Elle formait des bancs naturels dans les chenaux et sur les bordures des estrans. Avant 1750, cette espèce était fortement draguée ce qui a conduit aux premières interdictions de pêche qui ont été mises en place pendant trois ans. Les années suivantes, d'autres interdictions sont apparues, comme en 1759, avec une interdiction de pêcher au moment des frais, ou encore en 1766, avec l'interdiction de vendre des

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

huîtres de mai à août (Bouchet et al., 1997). Les huîtres ont ainsi pu regagner l'espace permettant par la suite une reprise de l'exploitation. S'en sont suivi de nouvelles pénuries, menant en 1849 à l'élaboration de parcs fermés pour favoriser la reproduction des huîtres. De 1855 à 1865, un collecteur idéal est recherché pour résoudre les problèmes du captage et de détroquage. C'est Mr MICHELET qui va mettre au point la composition de l'enduit hydraulique adéquat en 1866 en se basant sur le principe de la tuile mastiquée du docteur KEMMERER dans l'île de Ré. Cette invention est capitale et à partir de 1868, le nombre de tuiles chaulées ne cessera d'augmenter : 1,5 millions en 1870, 5 millions en 1872. Le procédé sera rapidement exporté dans les autres régions françaises, en Bretagne notamment (Bouchet et al., 1997). C'est ainsi que la production de cette huître a connu son âge d'or dans les années 1870.

En parallèle, en 1868, le « Morlaisien », navire chargé d'huîtres creuses portugaises (*Crassostrea angulata*), est pris dans une violente tempête l'obligeant à s'abriter dans l'estuaire de la Gironde. Des huîtres sont jetées par-dessus bord mais certaines survécurent et proliférèrent. En quelques années, elles se sont reproduites sur tout le littoral gascon, gagnant à son tour le Bassin d'Arcachon. D'abord dénigrée, cette huître a rapidement fait de nombreux adeptes.

Mais dans les années 1920, une épizootie de cause incertaine a décimé une grande partie du stock d'huîtres plates autochtones, diminuant sa culture en faveur de celle de l'huître portugaise. Se met alors en place une culture des deux espèces, particularité de l'ostréiculture locale jusqu'à la fin des années 1960. En effet, entre 1967 et 1971, les ostréiculteurs ont dû faire face à trois épizooties qui ont décimé les dernières gravettes et toutes les huîtres portugaises, au point qu'en moins de 2 ans, elles ont totalement disparu du Bassin d'Arcachon. Il fut alors décidé, en 1970, d'importer une nouvelle variété d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas* en provenance du Japon et de Colombie Britannique : c'est le début de l'opération "RESUR" (Buestel et al., 2009).

Dès 1973, des captages importants de naissains de cette espèce ont été observés, et aujourd'hui encore, l'huître japonaise demeure la seule huître élevée au sein du Bassin d'Arcachon. Les conditions naturelles y sont particulièrement favorables à sa reproduction.

Cependant, le destin de cette huître ne fut pas sans ombre jusqu'à nos jours. Une très grave crise est survenue dans les années 1977 à 1981. La présence dans les eaux du Bassin de tributylétain, molécule organique toxique entrant dans la composition des peintures antisalissures de l'époque a entraîné des effets néfastes. En effet, dès 1974, les huîtres du Bassin présentaient des anomalies de la croissance conduisant à l'élaboration d'une structure feuilletée de la coquille, à un épaissement des valves et finalement à une altération de la morphologie de l'huître (Bouchet et al., 1997). De plus des

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

perturbations de l'embryogénèse et du développement larvaire de *Crassostrea gigas* apparaissent (Bouchet et al., 1997). Une mortalité massive et rapide des larves dès les premiers jours de leur évolution dans le milieu est observée (Robert and His, 1981). Cette crise ostréicole provoquée par l'emploi de ces produits anti-salissures à base d'étain (TBT), a montré la sensibilité du Bassin à l'introduction de substances allochtones (biocides). Par conséquent, dès 1982, un arrêt de l'utilisation de ce composé a été imposé pour les embarcations de moins de 25 m. S'en suit dès l'été 1982 et jusqu'à l'été 1997 une reproduction normale de l'huître creuse dans le Bassin.

C'est ainsi que depuis les années 1980, le Bassin d'Arcachon est devenu le premier centre de reproduction des huîtres creuses en France.

Dans les années 1997, un dépôt de brevet concernant la production d'huîtres triploïdes a été déposé et c'est véritablement avec le développement de la culture de ces huîtres que la part de naissain en provenance d'écloseries a augmenté (Buestel et al., 2009). En effet cette année-là, le laboratoire de l'Ifremer de La Tremblade en Charente-Maritime obtient des huîtres creuses tétraploïdes, comportant quatre paires de chromosomes qui, croisées à des individus diploïdes du milieu naturel (dotés de deux génomes de base), donnent des triploïdes. L'avantage apparent est que ces huîtres sont dites stériles et donc ne produisent pas de laitance. Les huîtres laiteuses (pleines) étant peu appréciées par les consommateurs. On parle alors d'huîtres des quatre saisons. Le but était aussi d'obtenir une huître plus résistante avec une croissance plus rapide car son énergie n'est pas utilisée à la reproduction (<http://mer-littoral.eelv.fr/les-huitres-triploides/>).

Cependant, le tableau s'est noirci à nouveau les années suivantes, puisqu'en 1998, la saison de reproduction a été caractérisée comme très atypique, avec un très faible niveau de captage. L'impact sur l'économie locale en a été fortement négatif. C'est pourquoi dès cette année et pendant les années qui suivront un recueil de données est constitué dans le cadre de la mise en place d'un programme pluriannuel destiné à mieux comprendre les raisons de la variabilité du recrutement larvaire. Au cours des années suivantes, l'intensité de captage a été très variable : bonne voire excellente en 1999, 2001, 2003, 2004, 2006, 2008 et 2012, moyenne en 2000, 2002, 2005, 2007 et de 2009 à 2011 (Auby et al., 2012).

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

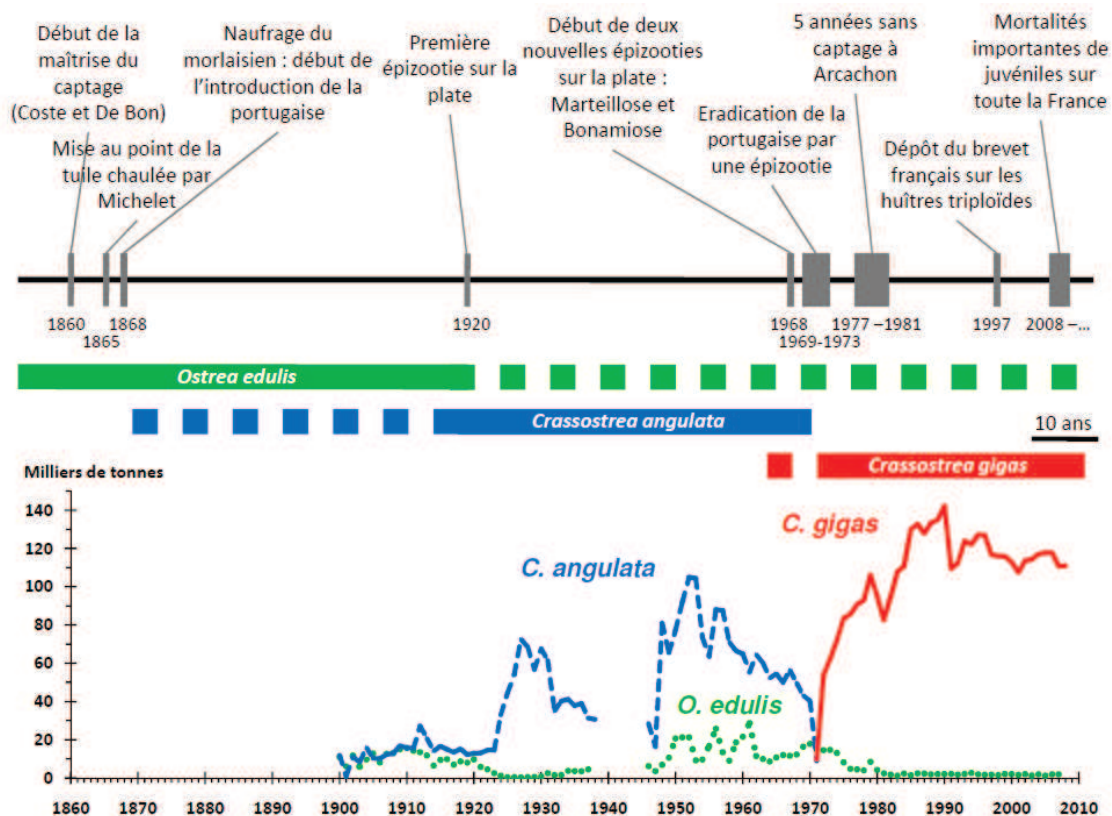


Figure 4 : Principaux événements marquants de l'ostréiculture française et évolution de la production ostréicole française depuis 1900 pour les trois espèces d'huîtres cultivées en France (Buestel et al., 2009, Gouletquer et al., 1997, Bernard 2011)

### 1.3.2. Les autres espèces concernées

Le Bassin d'Arcachon abrite le plus grand herbier à zostères naines (*Zostera noltei*) d'Europe, présentant à la fois un intérêt écologique et patrimonial, un intérêt paysager sous-marin, un intérêt économique (zones de reproduction et de nurseries) et scientifique (indicateurs de perturbation et d'évolution du domaine côtier) (Auby et al., 2010). Capable de modifier leur propre environnement, les herbiers sont qualifiés d'espèces « ingénieur de l'écosystème » (Jones et al., 1997, 1994). En effet, de par leur existence, ils créent une faible énergie hydrodynamique pouvant favoriser le dépôt des sédiments (Gacia and Duarte, 2001) et réduire leur remise en suspension (Bos et al., 2007; Gacia and Duarte, 2001; Ward et al., 1984). De par leur rhizosphère pouvant atteindre d'importantes profondeurs, ils modifient les propriétés physiques (stabilisation) et chimiques (oxygénation) du substrat colonisé. Or, depuis quelques années, une décroissance notable de la biomasse des herbiers de zostères est observée. Au cours de l'hiver 2005-2006 différents observateurs du milieu ont alerté l'opinion, rapportant que ces herbiers présentaient de très faibles densités (Auby et al., 2011). Dans les zones les plus orientales du Bassin, certains signalaient que les zostères avaient même disparu. Grâce à la mise en œuvre de la Directive Cadre sur l'Eau, des cartographies complètes des herbiers de

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

zostères naines du Bassin ont été réalisées en 2007. Ces dernières viennent confirmer les régressions signalées par les différents observateurs, la couverture de l'herbier passant de 6092 à 4564 ha entre 2005 et 2007 (Auby et al., 2011). Les facteurs environnementaux (dragage, migration de dunes, eutrophisation, hausse du niveau marin, hausse des températures), biologiques (maladie, broutage, bioturbation, marée noire), et les événements climatiques extrêmes (vagues de chaleur) ont été identifiés comme les principales causes du déclin des herbiers dans les régions tempérées et tropicales (Bernard et al., 2005; Orth et al., 2006; Waycott et al., 2009). Mais ces facteurs ne seraient pas les seuls responsables de la régression des herbiers dans le Bassin. Une étude a été menée en 2012 en exposant en laboratoire des zostères naines à différentes températures (température inférieure et supérieure à la température idéale de développement et température idéale de développement) ainsi qu'à différents polluants. Le cuivre et un mélange de pesticides couramment retrouvés dans les eaux du Bassin ont été imposés seuls, ou en mélange, à des concentrations dix fois supérieures à celle du milieu, afin d'identifier les effets sur la croissance des zostères. Finalement, une exacerbation de l'effet des contaminants seul ou en mélange a été observée en présence des températures supérieures, démontrant bien l'impact de la pollution et du changement climatique sur la régression des herbiers dans le Bassin (Gamain et al., 2016a). Vivant à proximité des prairies de zostères et s'accrochant à celles-ci grâce à leur queue préhensile, les hippocampes, autre espèce typique du Bassin d'Arcachon, se raréfient à l'échelle mondiale, victimes de la dégradation de leur habitat lagunaire, mais aussi d'une surexploitation liée aux pratiques de médecine chinoise, à l'aquariophilie ou au commerce de souvenirs touristiques (Littaye et al., 2011). Au niveau du Bassin d'Arcachon, l'abondance des hippocampes n'est pas bien connue. Une enquête menée en 2011 indiquait la présence de populations importantes dans les années 1970-1975, puis un déclin dans les années 1980. Deux hypothèses ont été évoquées pour expliquer cette diminution : leur exploitation pour la création de souvenirs balnéaires mais aussi la qualité de l'eau.

**Le Bassin d'Arcachon présente donc les caractéristiques d'une crise écologique à laquelle il faut trouver des réponses. Pour cela il est important de cerner l'ensemble des caractéristiques de l'huître, de comprendre son cycle de vie et de voir quelles actions ont été mises en place pour répondre aux bouleversements rencontrés par la filière ostréicole.**

## 2. Modèle biologique

### 2.1. Présentation du modèle

L'huître creuse du Pacifique (ou huître japonaise) *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) (Figure 5) est un mollusque bivalve originaire du Pacifique Nord-Ouest, dont la position systématique est maintenant bien établie (Tableau 1).

Cette espèce a été introduite, le plus souvent à des fins aquacoles, dans plus de 48 pays comme, par exemple, le Canada, l'Australie, l'Afrique du Sud ou la France (Figure 6). L'huître creuse *Crassostrea gigas* constitue une part importante de la production aquacole mondiale, avec 555 913 de tonnes estimées en 2013 (Fao, 2015). La France représente le 4<sup>ème</sup> producteur ostréicole mondial, l'huître creuse étant l'espèce principalement produite (FAO, 2010) avec près de 101 100 tonnes produites en 2012 (CNC, 2012).

Faisant partie de plus de 315 exploitations ostréicoles, l'huître creuse *Crassostrea gigas* est la principale espèce cultivée dans le Bassin d'Arcachon. Les éleveurs bretons, normands et méditerranéens s'approvisionnent majoritairement en naissain d'origine arcachonnaise et il était estimé en 2004 que 60 à 70 % des huîtres japonaises commercialisées en France étaient natives du Bassin d'Arcachon (Auby and Maurer, 2004a).

Cependant, suite aux différents problèmes de captage rencontrés depuis 2008, aucun chiffre officiel n'est actuellement paru, mais il serait estimé à 30 % la nouvelle proportion d'huîtres commercialisées natives du Bassin. Actuellement près de la moitié des huîtres creuses proviennent des entreprises de Poitou-Charentes (37 093 tonnes contre 6 349 tonnes pour la région Aquitaine) (Figure 7) (Agreste Primeur, 2014).

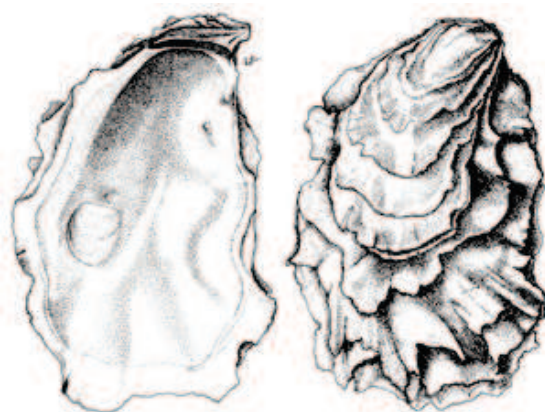
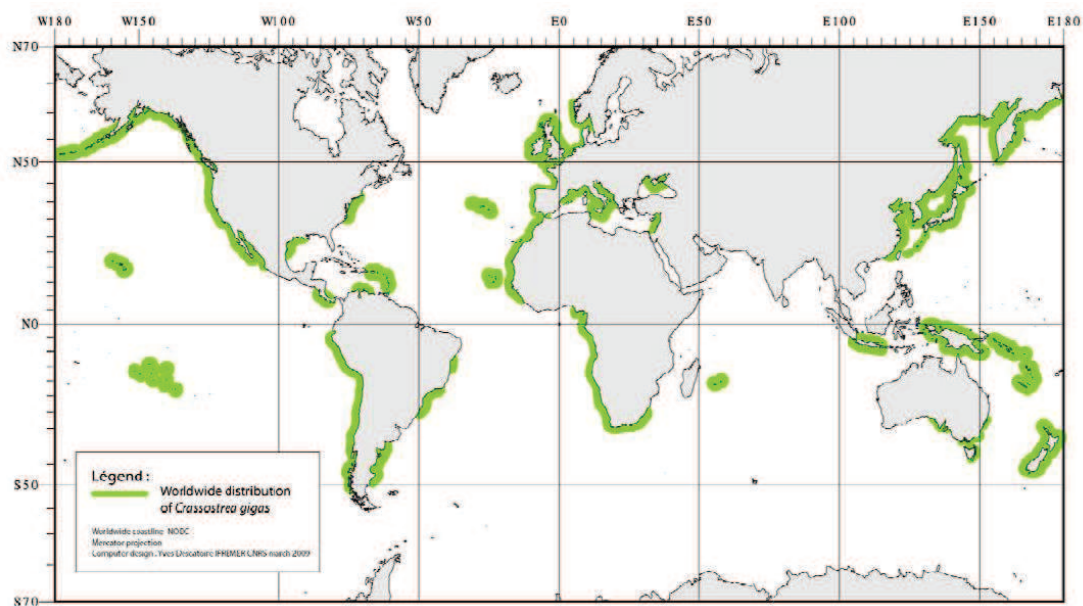


Figure 5 : Huître creuse adulte (FAO, 2015)

Tableau 1 : Position systématique de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (<http://marbef.org/data>)

Règne	Animal
Embranchement	Mollusque
Classe	Bivalve
Sous classe	Pteriomorpha
Ordre	Ostreida
Super Famille	Ostreidea
Famille	Ostreidae
Sous-Famille	Crassostreinae
Genre	<i>Crassostrea</i>
Espèce	<i>Gigas</i>

Figure 6 : Aire de répartition de l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* (Miossec, 2009)



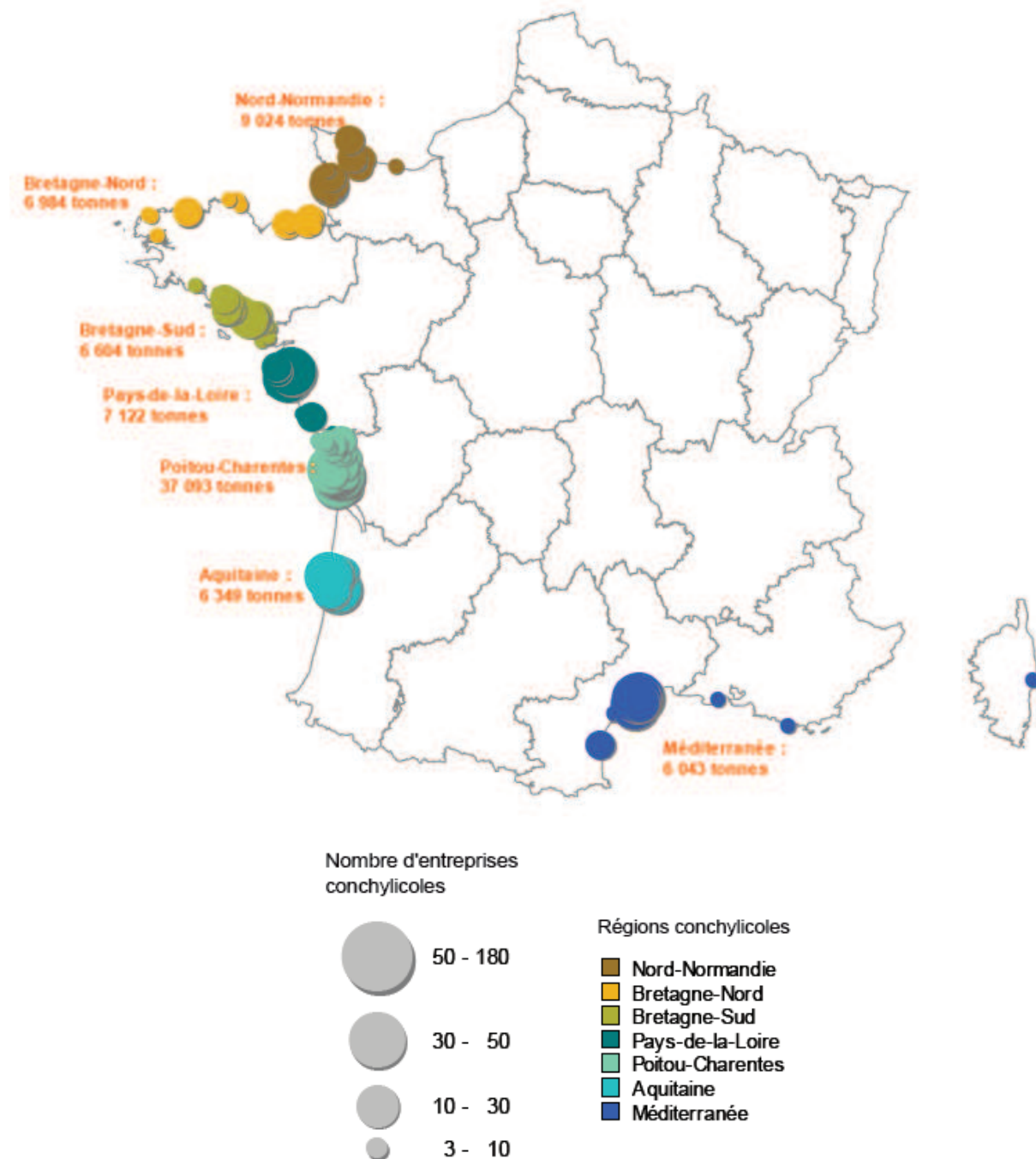


Figure 7 : Recensement de la conchyliculture en France (issue de Agreste Primeur, 2014)

L'huître creuse japonaise du Pacifique vit dans la zone intertidale où elle peut coloniser les substrats rocheux intertidaux. Des populations ont également été rencontrées sur substrat meuble, sur des fonds vaseux et sablo-vaseux (FAO, 2015). Dans ces milieux les larves se fixent sur des coquilles ou autres petits substrats durs en surface de la vase, puis en grandissant ces huîtres deviennent à leur tour des supports pour la fixation des naissains.

L'huître creuse est une espèce marine présentant une grande tolérance aux variations des conditions environnementales. Elle est qualifiée d'euryhaline puisqu'elle peut vivre à des salinités optimales

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

comprises entre 20 ‰ et 25 ‰, mais peut survivre à des salinités supérieures à 35 ‰ et se reproduire à des salinités inférieures à 10 ‰ (FAO, 2015). Cette espèce est aussi eurytherme puisqu'elle est capable de supporter de larges gammes de températures comprises entre 1,8 °C et 35 °C (FAO, 2015). Ces caractéristiques lui permettent d'être cultivée aussi bien dans des eaux océaniques que dans les estuaires (Miossec et al., 2009 ; FAO, 2015) et expliquent son introduction réussie dans diverses régions du globe.

*Crassostrea gigas* est un filtreur. Elle filtre l'eau de mer à raison de 2 à 5 L.h<sup>-1</sup> et absorbe ainsi matière organique et organismes planctoniques dont elle se nourrit. Les algues phytoplanctoniques sont sa principale nourriture.

### 2.2. Anatomie

*Crassostrea gigas*, comme l'ensemble des huîtres, est un animal à corps mou, contenu dans une coquille à deux valves asymétriques : une valve inférieure (gauche) creuse pour recevoir le corps mou et qui permet à l'organisme de se fixer au substrat ainsi qu'une valve supérieure (droite) plus plane. Cette coquille est constituée de trois feuillets de l'extérieur vers l'intérieur : le périostracum, la conchyoline et la calcite-ostracum aussi appelée nacre (Salvo, 2010). Les deux valves sont rattachées par un ligament charnière au niveau du crochet. Elles vont s'ouvrir et se fermer pour assurer les fonctions de respiration et de nutrition. Cette action mécanique est assurée par le muscle adducteur (Bijoux, 2014; Lewbart, 2011). Les organismes marins vivants au niveau de la zone intertidale sont ainsi adaptés à la dessiccation grâce à la coquille. Celle-ci permet de protéger le corps de l'huître de son environnement extérieur.

A l'intérieur de la coquille se trouve donc le corps mou. Il est en parti composé du manteau, organe présentant deux lobes couvrant l'entièreté de l'organisme, exception faite en face ventrale où une petite ouverture est aménagée permettant les échanges avec le milieu extérieur (Figure 8)(Miossec et al., 2009). Le manteau a, entre autre, la propriété de sécréter la coquille en utilisant le calcium contenu dans l'eau de mer.

Apposées sur le manteau se trouvent les branchies, organes lamellaires constitués de quatre feuillets, assurant la fonction respiratoire de l'huître par prélèvement de l'oxygène dans l'eau de mer. Ces branchies ont aussi un rôle dans l'alimentation. L'huître étant un organisme filtreur suspensivore, les branchies vont filtrer les particules en suspension présentes dans la colonne d'eau à l'aide du mucus qui les recouvrent (Miossec et al., 2009). Parmi ces particules vont se trouver des éléments nutritifs (ex : phytoplancton). Ceux-ci vont être acheminés vers la bouche par des battements ciliaires puis vers

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

le petit œsophage et enfin dans la glande digestive. Si les particules ne sont pas nutritives, elles peuvent être agglomérées puis excrétées sous forme de pseudo-fèces grâce aux mouvements saccadés du muscle adducteur. Ce tri est réalisé au niveau des palpes labiaux.

Accolé au muscle adducteur et au rectum se trouve le cœur musculaire, composé d'un ventricule et de deux oreillettes. Il assure la circulation de l'hémolymphe à travers l'organisme, afin de baigner les organes et permettre à l'oxygène dissout de diffuser directement dans les cellules. L'hémolymphe est expulsée par le ventricule et récupérée par des sinus. Les hémocytes, cellules de la défense immunitaire, composent aussi l'hémolymphe. Le système nerveux de l'huître est représenté par deux ganglions : un cérébro-pleural et un viscéral.

Juste à côté du cœur et bien que peu visible en période de repos sexuel se situe la gonade, entourant l'hépatopancréas. Elle vient à se développer massivement en période de gamétogénèse.

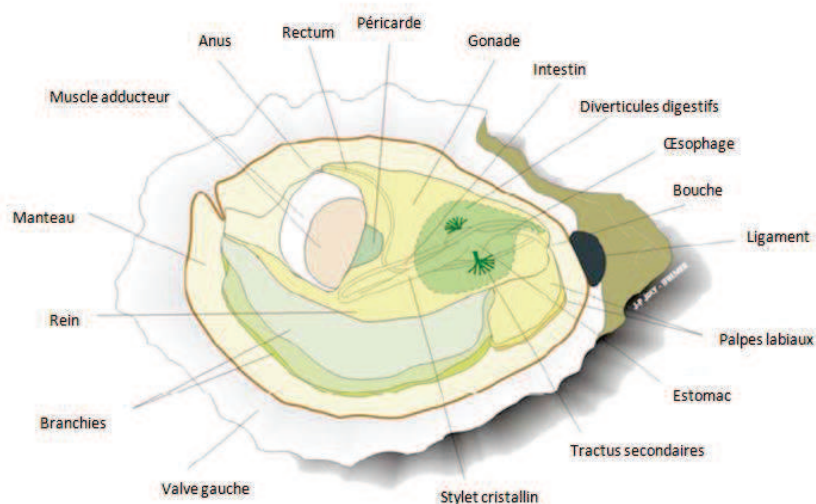


Figure 8 : Schéma et photo de l'anatomie interne de l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Issue de Miossec et al., 2009).

Illustration : J.P JOLY (IFREMER). Photo : Perrine GAMAIN

### 2.3. Cycle de vie et de reproduction

L'huître creuse *Crassostrea gigas* est dite gonochorique (caractéristique des espèces chez lesquelles les gamètes mâles (spermatozoïdes) et les gamètes femelles (ovules) sont produits par des individus différents) et protandre, modalité d'hermaphrodisme où l'organisme est mâle, puis femelle. Il a été constaté chez des individus de 1 an, un pourcentage élevé de mâles, atteignant 70 %. Au fil des saisons de reproduction, et donc des années, les femelles apparaissent majoritaires (Auby and Maurer, 2014). Ce changement de sexe peut s'opérer au cours d'une même saison de reproduction, mais le plus souvent, ce processus se déroule au cours de saisons consécutives (IFREMER, 2012). On parle ainsi d'hermaphrodisme asynchrone (Gerard et al., 1995). Les individus matures sont donc soit mâles soit femelles.

La reproduction de l'huître et l'obtention d'individus adultes est rythmée par différentes phases : l'initiation de la gamétogénèse, la gamétogénèse, la ponte puis la fécondation, une phase de vie larvaire puis post larvaire.

#### 2.3.1. La gamétogénèse

La gamétogénèse correspond à la fabrication des cellules sexuelles. Ce processus évolue au cours des saisons.

Dans le Bassin d'Arcachon, les huîtres présentent une saison de ponte allant de début juin à mi-septembre (His, 1976). Ainsi à la fin de l'automne, et donc une fois la saison de reproduction terminée, la gonade présente une activité réduite, ceci, jusqu'au printemps suivant, où différentes phases vont se succéder, permettant d'assurer une nouvelle saison de reproduction.

Vers mars-avril, la gamétogénèse redevient active. C'est alors que débute une accumulation de glucides. Ceux-ci seront par la suite transformés en lipides de réserves des gamètes. Le contenu maximal en glucides est atteint au mois de mai et c'est environ un mois après qu'est observé le pic lipidique (Auby et al., 2014). Selon les conditions environnementales, la maturité sexuelle maximum est atteinte entre mai et juillet. C'est ensuite que débutera la ponte.

Plusieurs facteurs contrôlent le déroulement de la gamétogénèse. Des facteurs intrinsèques tels que l'âge, la taille, le niveau des réserves glucidiques formées ainsi que les facteurs neuroendocriniens peuvent jouer un rôle sur le bon déroulement de la gamétogénèse (Gerard et al., 1995). Mais l'environnement même où l'individu se trouve peut influencer ce processus. Parmi ces facteurs externes plusieurs sont cités actuellement dans la littérature : la nourriture, la température de l'eau,

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

la salinité et la photopériode. C'est en jouant sur les cycles de température et de photopériode que les écloséries arrivent à obtenir des gamètes matures sur une large majorité de l'année (Pouvreau et Lepennec, 2006). La quantité de nourriture présente dans le milieu au moment de la gamétogénèse influera sur la quantité de réserves formées en période hivernale et sera le facteur prépondérant de la quantité de gamètes qui seront produits par la suite (Deslous-Paoli, 1981; Pouvreau et Lepennec, 2006). Ce facteur peut donc représenter une des causes premières pour expliquer les différentes crises au sein du Bassin. Cette hypothèse sur le rôle de la nourriture dans le succès de la reproduction de l'huître creuse dans le bassin d'Arcachon, a été étudiée au cours de la thèse de Sonia GASMI de 2013 à 2016 réalisée en parallèle des travaux présentés dans ce manuscrit.

Habituellement, la gamétogénèse commence lorsque les températures de l'eau avoisinent les 8 °C à 11 °C, permettant de déclencher les mitoses et donc la fabrication des cellules sexuelles. La température agirait selon la loi d'Arrhenius sur la gamétogénèse, en ralentissant ou accélérant les processus dans une gamme allant de 8 °C à 30 °C. Des températures élevées ne feraient donc qu'accélérer le processus de maturation des cellules sexuelles (Pouvreau et Lepennec, 2006).

Le rôle de la salinité au moment de la gamétogénèse reste encore discuté, les huîtres creuses étant des mollusques bivalves euryhalins (Gerard et al., 1995). La FAO en 2005 a estimé que la gamétogénèse pouvait débiter pour des salinités comprises entre 15 u.s.i et 32 u.s.i.

L'impact de la photopériode est peu documenté.

Une fois la gamétogénèse terminée, l'émission des gamètes (qui a lieu généralement entre les mois de juillet et août) va être réalisée dans le milieu extérieur : on parle de ponte.

### **2.3.2. La ponte et la fécondation**

Le déclenchement des premières pontes est lié à la température de l'eau (Bouchet et al., 1997). Il n'y a pas de ponte possible en dessous de 20 °C (Auby et al., 2014).

Quand les conditions environnementales sont adéquates, la ponte se déclenche. Le frai de l'huître mâle, c'est-à-dire l'émission des produits sexuels, se caractérise par un jet continu blanc tandis que l'huître femelle éjecte les gamètes par clappements des deux valves.

Les pontes peuvent être de deux types. Elles sont dites massives lorsque les géniteurs de différentes zones du milieu fraient ensemble. Au contraire, si les individus fraient les uns après les autres, on parle de pontes diffuses. Une autre distinction se fait concernant le frai. Si la gonade de l'huître vient à émettre la totalité de ses gamètes, on dit que le frai est total. Au contraire si l'individu ne se vide pas

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

totale, on parle de frai partiel. Dans ce dernier cas l'individu pourra reprendre un nouveau frai au cours de la même saison, lorsque les conditions environnementales adéquates seront à nouveau réunies. Ainsi, un individu peut venir à réaliser des pontes 4 à 9 fois au cours d'une même saison de reproduction avec reformation de gamètes si les conditions le permettent (His, 1991).

Une fois dans le milieu extérieur, la fécondation va pouvoir se réaliser. On parle alors de fécondation externe. Les gamètes mâles et femelles vont se rencontrer quelques minutes après leur émission. Ceci est facilement observable au microscope. Très rapidement les premières divisions cellulaires débutent. Des divisions méiotiques vont survenir avec formation de deux globules polaires. Lorsque ceux-ci sont observables au microscope, ils indiquent une réussite de la fécondation (FAO, 2015). La durée de la phase embryonnaire est rapide puisque 12h après la fécondation sont obtenus les premiers stades larvaires.

### 2.3.3. Les stades larvaires

L'ensemble des données citées ci-dessous ont été recueillies à travers la lecture de la thèse d'Olivier Geffard (2001), d'Edouard His (1991) et de l'ensemble des rapports annuels IFREMER sur la reproduction de l'huitre creuse dans le Bassin d'Arcachon depuis 2001.

Pour des températures comprises entre 22 et 24 °C, 12h après la fécondation, l'ovule précédemment fécondé évolue en larve trocophore, caractérisée par la présence de cils, lui permettant de se déplacer par mouvements de rotation (Figure 9). Dès ce stade, la larve est dite pélagique puisqu'elle se déplace dans la colonne d'eau.

12h plus tard, soit 24h après la fécondation, la larve véligère est formée. Toujours pélagique, elle est facilement identifiable grâce à la future coquille en formation, constituée de deux valves reliées par une charnière, et par sa forme caractéristique de D, d'où sa dénomination commune de larve D. D'une hauteur d'environ 60 µm, cette larve véligère, comme son nom l'indique possède un vélum, voile cilié, lui permettant de se déplacer et de capter la nourriture.

6 jours après la fécondation, un crochet, dénommé umbo, vient se former au niveau de la charnière. Il devient visible pour une hauteur de larve de 110 µm. Cette larve est dite umbonée.

A partir du moment où une taille de 250 µm est atteinte, la larve est dite oeuillée, en lien avec l'apparition d'une petite tâche oculaire ayant, pour la larve, un rôle sensoriel.

Enfin, vers 300 µm, le dernier stade larvaire, appelé pédivéligère est atteint. La larve se munit d'un pied lui permettant de sélectionner le support sur lequel elle ira se fixer. Le terme de recrutement est

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

utilisé pour décrire le processus aboutissant à l'arrivée de nouveaux individus au sein du stock reproducteur (Bernard, 2011). La recherche d'un substrat pour la fixation va se faire en deux phases. Soit la larve tombe sur le fond et le support trouvé ne lui convient pas : à ce moment-là, elle se remet à nager. Si le support lui convient, une phase de sécrétion de ciment par le pied va lui permettre de se fixer définitivement : c'est sur celui-ci qu'elle grandira pour devenir naissain puis adulte. Pour cela une métamorphose va survenir. Il y a disparition du velum, régression du pied, formation des palpes labiaux (permettant d'entraîner la nourriture vers la bouche) et développement des branchies. La coquille définitive est aussi sécrétée.

Ainsi jusqu'au stade pédivéligère, la vie larvaire est pélagique. Ce n'est qu'ensuite, une fois le support trouvé et la fixation réalisée qu'est adoptée une vie benthique.

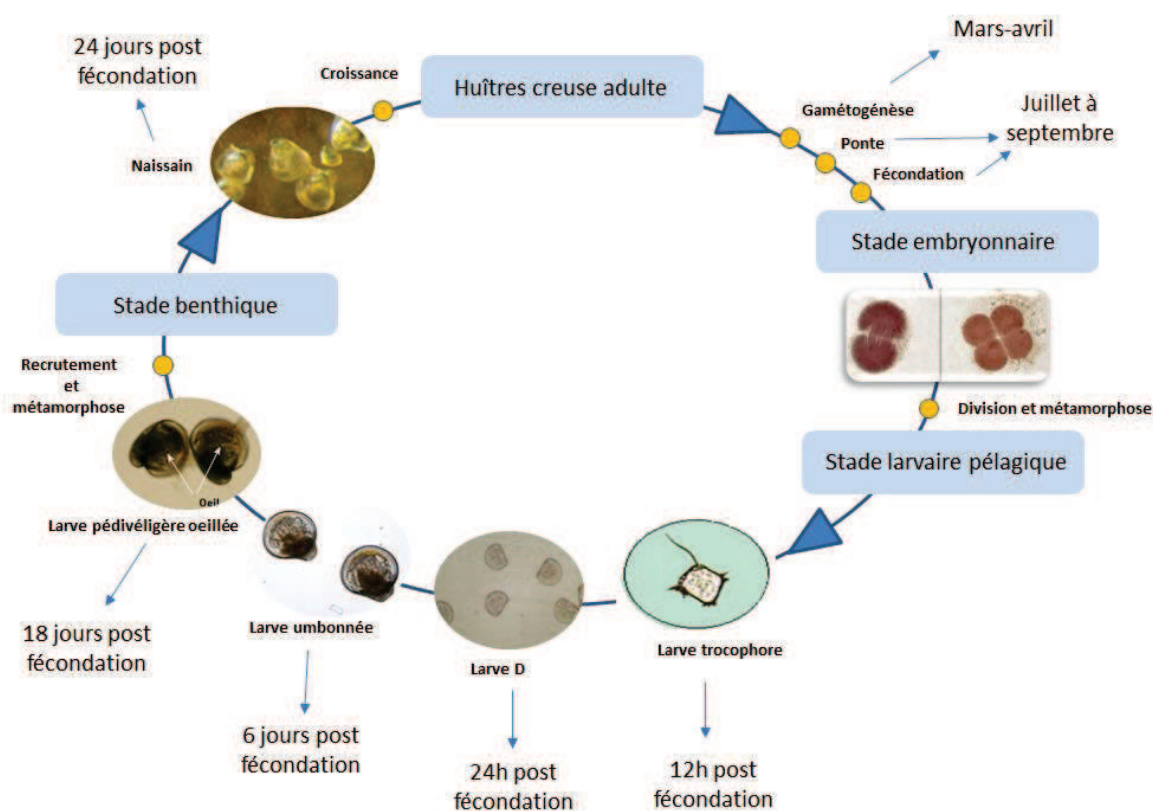


Figure 9 : Cycle de développement de l'huître creuse *Crassostrea gigas*

Au cours du développement larvaire, le mode de nutrition des larves varie. Jusqu'à 1 ou 2 jours, les larves sont dans une phase dite endotrophe où les réserves vitellines de l'œuf représentent la seule source d'énergie. Après quelques jours de développement, en plus des réserves vitellines, des aliments exogènes commencent à être ingérés, on parle de phase mixotrophe. Enfin, passé cette phase, les

larves et huîtres adultes ne se nourrissent plus qu'à partir de nourriture exogène : phase exotrophe (Ben Kheder, 2007).

#### 2.4. Les huîtres cultivées et les huîtres sauvages

L'effort de reproduction dans le bassin d'Arcachon ne peut tenir à la seule présence des huîtres dites cultivées ou d'élevage. Dans un même milieu, il est peu commun de rencontrer une même espèce sous deux modes de vie différents. Cependant, alors que les huîtres cultivées sont élevées (mise en poche, surélevées sur des tables, calibrées), les huîtres sauvages vont venir s'accumuler au niveau de gisements naturels ou au niveau de parcs laissés à l'abandon, non entretenus (Auby et Maurer, 2004a). En effet à l'état naturel, les huîtres forment des récifs biogènes de substrat dur (Ruesink et al., 2005) formant des agrégats d'huîtres dont les caractéristiques sont très hétérogènes, que ce soit en terme d'âge, de taille ou de morphologie (Figure 10).



*Figure 10 : Récifs d'huîtres sauvages sur des parcs abandonnés en premier plan vs huîtres cultivées sur table en arrière-plan*

En 2011, une étude a été menée en collaboration avec l'agence des aires marines protégées, l'institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer), la station marine d'Arcachon mais aussi la direction départementale des territoires et de la mer de Gironde et la délégation à la mer et au littoral afin de quantifier et de caractériser les stocks d'huîtres sauvages et cultivées dans le Bassin d'Arcachon. Pour cela deux approches différentes ont été utilisées afin d'estimer le plus justement possible les huîtres cultivées et les huîtres sauvages. Le stock d'huîtres en élevage a été estimé à l'aide de déclarations de producteurs tandis que le stock d'huîtres sauvages a été estimé sur le terrain avec une centaine de stations échantillonnées sur 4 semaines. Finalement 82 500 tonnes d'huîtres vivantes ont été recensées sur la totalité du Bassin d'Arcachon, se répartissant entre 16 600 tonnes d'huîtres cultivées (en 2009) et 65 000 tonnes d'huîtres sauvages (juin 2011) (Scourzic et al., 2011).



## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

Mais, en 1997, l'Ifremer a mis sur le marché des huîtres triploïdes stériles mais à plus fort taux de croissance, qui représentent actuellement environ 30% des huîtres élevées dans le bassin d'Arcachon (Dubourg, 2012). Cependant, il est établi depuis plusieurs années que ces huîtres peuvent parfois produire, bien qu'en faible quantité, des produits sexuels (spermatozoïdes et ovocytes). Néanmoins, aucune preuve scientifique ne permet à ce jour d'établir que ces produits peuvent donner lieu à une reproduction dans le milieu naturel (Ifremer, 2009).

### 2.5. Mode de production de l'huître

Le cycle de production des huîtres prêtes à la consommation se fait sur une durée de 3 à 4 ans et se décompose en plusieurs grandes étapes (Meresse and Frostin, 2012) :

- (1) **Le captage** qui consiste pour l'ostréiculteur à capter les larves nouvellement formées à l'aide de collecteurs (tuiles recouvertes de chaux ou coupelles). Cette étape se déroule en période estivale où l'huître adulte et mûre émet dans le milieu naturel les gamètes, qui, après fécondation et développement, donnent des larves se déplaçant avec les mouvements de la masse d'eau pour ensuite se fixer soit dans le milieu naturel soit sur ces collecteurs.
- (2) **Le demi-élevage** qui consiste à détacher la larve devenue naissain (2 à 4 cm) pour la mettre dans des parcs d'élevage pour une durée d'un ou deux ans.
- (3) **L'élevage** pour lequel l'ostréiculteur met les huîtres en poches avec un maillage variable selon la taille des huîtres pour ensuite les disposer dans l'environnement naturel sur des tables en fer posées directement sur le sable. Des zones riches en nourritures (phytoplancton) sont recherchées, le but étant de favoriser leur croissance. Cette étape se déroule sur une à deux années.
- (4) **La finition** qui consiste à entreposer les huîtres dans l'eau de mer en bassins artificiels dénommés maline. Chaque individu est alors lavé, trié et calibré. Les huîtres sont ainsi prêtes à être vendues.

L'ostréiculture est donc profondément dépendante de l'approvisionnement en juvéniles si elle veut obtenir des huîtres adultes commercialisables. Cet approvisionnement est en lien direct avec le captage et le Bassin d'Arcachon est connu historiquement comme étant un centre naisseur. Il se doit de faire perdurer cette activité, d'autant plus qu'il fournit des naissains aussi bien pour les bassins de Basse Normandie, ou de Bretagne que pour l'étang de Thau (Figure 11). La nécessité d'un approvisionnement important en naissains s'est encore accrue dans l'ensemble des bassins conchylicoles depuis 2008, année d'apparition des fortes mortalités de juvéniles d'huîtres creuses (*Crassostrea gigas*).

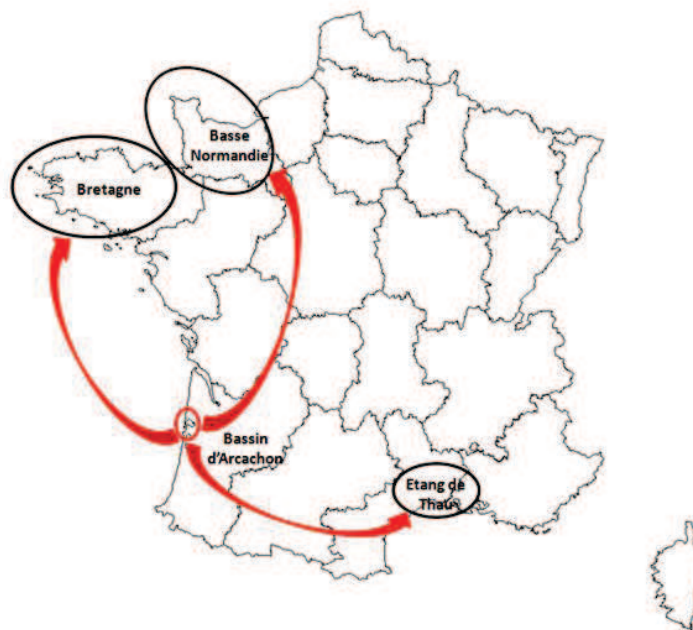


Figure 11 : Transfert des naissains du Bassin d'Arcachon et les autres bassins de productions ostréicoles en France (adapté de Meresse et Frostin, 2012)

## 2.6. La variabilité de recrutement de l'huître creuse

### 2.6.1. Les programmes de recherche

Le Bassin d'Arcachon est un site dans lequel la reproduction de l'huître a été particulièrement suivie et étudiée depuis de nombreuses années. En effet, la collecte et le comptage des larves d'huîtres y ont débuté en 1927 et se sont poursuivis jusqu'à l'époque actuelle (Auby et Maurer, 2004). De plus, les récents questionnements concernant l'explication des différentes crises rencontrées font l'objet de plusieurs programmes de recherche mis en œuvre localement depuis plusieurs années. De 1999 à 2003, le programme Ifremer **SURGIBA** a été mené, ayant pour objectif d'étudier la reproduction des huîtres creuses dans le Bassin d'Arcachon et plus particulièrement d'étudier les causes de la variabilité du captage.

Parallèlement de 2001 à 2006, le projet Ifremer **MOREST** proposait une approche multidisciplinaire afin d'avoir des réponses concrètes et applicables au problème des mortalités estivales de *Crassostrea gigas*. L'objectif était de trouver des solutions pour limiter les mortalités en élevage par des nouvelles pratiques zootechniques basées sur une analyse de risques, l'endurcissement précoce et la sélection génétique ainsi que la collecte d'un ensemble de données fondamentales sur la physiologie-

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

immunologie de l'huître creuse, sur les pathogènes et leur virulence et sur les interactions entre l'hôte, les pathogènes et les paramètres environnementaux.

Dès 2004, Ifremer a lancé une nouvelle étude sur la variabilité du captage des huîtres creuses. Depuis, cette étude est reconduite chaque année. Les différents indicateurs suivis sont la maturation des huîtres adultes, la ponte, le suivi des concentrations larvaires en différentes zones du Bassin et des indicateurs physiques tels que la température.

En 2005, le Bassin d'Arcachon a connu une nouvelle crise ostréicole, qui a conduit à l'interdiction du ramassage, de la commercialisation et de consommation des coquillages, durant 5 semaines selon le principe de précaution, en raison de la présence d'une micro-algue toxique dans le milieu et/ou de résultats positifs des tests biologiques (nous avons alors en mémoire les tests sur la souris qui avaient à l'époque causé de multiples polémiques). La Région a ainsi mis en place un plan d'urgence afin de soutenir la filière qui initia la création du Comité Scientifique Ostréicole Aquitain, sous l'égide du Conseil Régional, réunissant des membres de la communauté scientifique universitaire régionale et nationale, les services de l'Etat et les professionnels de l'ostréiculture et de la pêche. Ce comité a participé à la mise en œuvre d'un programme de recherche : le programme **ASCOBAR** (Apport scientifique à la problématique conchylicole du bassin d'Arcachon) de 2007 à 2009, adapté à la problématique locale et environnementale du bassin d'Arcachon, portant sur l'alerte et la protection. Les objectifs de ce programme étaient d'acquérir des connaissances concernant la répartition spatio-temporelle des algues toxiques sur le proche plateau continental et leur origine (locale ou éloignée) et les modalités de leur entrée dans le Bassin d'Arcachon.

En parallèle, le **réseau VELYGER** de l'IFREMER (<http://wwz.ifremer.fr/velyger/>), après une phase de construction tout au long de l'année 2007, a réellement vu le jour en mars 2008 et s'est poursuivi jusqu'à fin 2010. L'observation et l'analyse d'une série d'indicateurs biologiques (maturation, date de ponte, abondance larvaire, intensité du recrutement, survie), hydrologiques et climatiques ont permis de mieux appréhender les causes de variabilité du recrutement de l'huître creuse en France. A partir de 2011, ce projet a donné naissance à un réseau national d'observation de la reproduction de l'huître creuse.

Parallèlement un projet de recherche nommé **RIPOST** (Recherche Interdisciplinaire sur la Problématique OSTRéicole du Bassin d'Arcachon : approches in situ et expérimentale) a été financé par l'Agence nationale de la recherche en 2010. Ce programme avait pour objectifs de caractériser les principales sources de contamination du Bassin d'Arcachon, leur nature et leur dynamique dans la

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

lagune, mais également de préciser les impacts toxiques de ceux-ci sur les populations d'huîtres (stade adulte et embryo-larvaire).

En 2012, suite aux trois années de mauvais captage dans le Bassin d'Arcachon (2009 à 2011) a été élaboré le programme de recherche FéLiBA (**F**écondité des huîtres en **L**ien avec la qualité de l'eau du **B**assin d'**A**rcachon), issu d'une collaboration entre le CRCAA (le **C**omité **R**égional **C**onchylicole **A**rcachon **A**quitaine), le SIBA, l'Ifremer, l'université de Bordeaux I, la DDTM Gironde (**D**irection **D**épartementale des **T**erritoires et de la **M**er) et l'Agence des Aires Marines Protégées. L'objectif de ce programme, dans la continuité des autres est, à travers des suivis renforcés, de comprendre les très faibles captages rencontrés au cours des dernières années.

Un autre programme a démarré en 2010 pour s'achever en 2013, le programme **OSQUAR** (ostréiculture et qualité du milieu : approche dynamique du Bassin d'Arcachon) dont l'objectif, dans la continuité des programmes en cours, était d'améliorer la connaissance du Bassin d'Arcachon par une meilleure définition et perception de sa qualité par l'ensemble des usagers. Ce programme s'intéressait aux caractéristiques des perturbations de l'écosystème et à la place occupée par des entités écologiques porteuses d'images de qualité de l'environnement telle que l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Finalement, ce programme se poursuit dans un deuxième volet débutant en 2013, volet nommé OSQUAR 2. C'est dans ce deuxième que s'intègre l'ensemble de cette étude. La toxicité d'un polluant ainsi que l'impact des variations des facteurs environnementaux sur un organisme peuvent varier au cours des différents stades de vie de cet organisme (MacInnes and Calabrese, 1979). Les études antérieures ont montré que les premiers stades de vie des organismes invertébrés marins (embryons et larves) sont moins tolérants aux polluants que les adultes de la même espèce (Connor, 1972; Martin et al., 1981; Quiniou et al., 2005). Ces jeunes stades sont alors appelés stade critiques et peuvent servir pour les tests de toxicité. A ce jour, l'espèce majoritairement utilisée dans les bioessais est l'huître creuse Japonaise *Crassostrea gigas*. C'est pourquoi l'ensemble de cette étude sera focalisée sur les premiers stades de vie de l'huître creuse et plus particulièrement sur l'un des tous premiers stades larvaires : le stade larve D, obtenu 24 heures après la fécondation. Jusqu'à présent, l'impact des variations de conditions de vie pendant ces premières heures n'a été que peu suivi. C'est ce que nous détaillerons dans le paragraphe suivant.

**Comme nous l'avons compris, le Bassin d'Arcachon a subi de nombreuses crises ces dernières années qui ont impacté la viabilité et le recrutement du stock d'huîtres. Les paramètres pouvant influencer le recrutement sont répertoriés dans le paragraphe suivant.**

### 2.6.2. Facteurs de variabilité du recrutement

Les variabilités du recrutement peuvent être liées aux possibles variations des différentes phases du cycle de vie de l'huître. De manière générale, le succès du recrutement de l'huître en milieu naturel dépend du stock de géniteurs, de l'effort de reproduction, de la survie larvaire et du succès de fixation de ces larves.

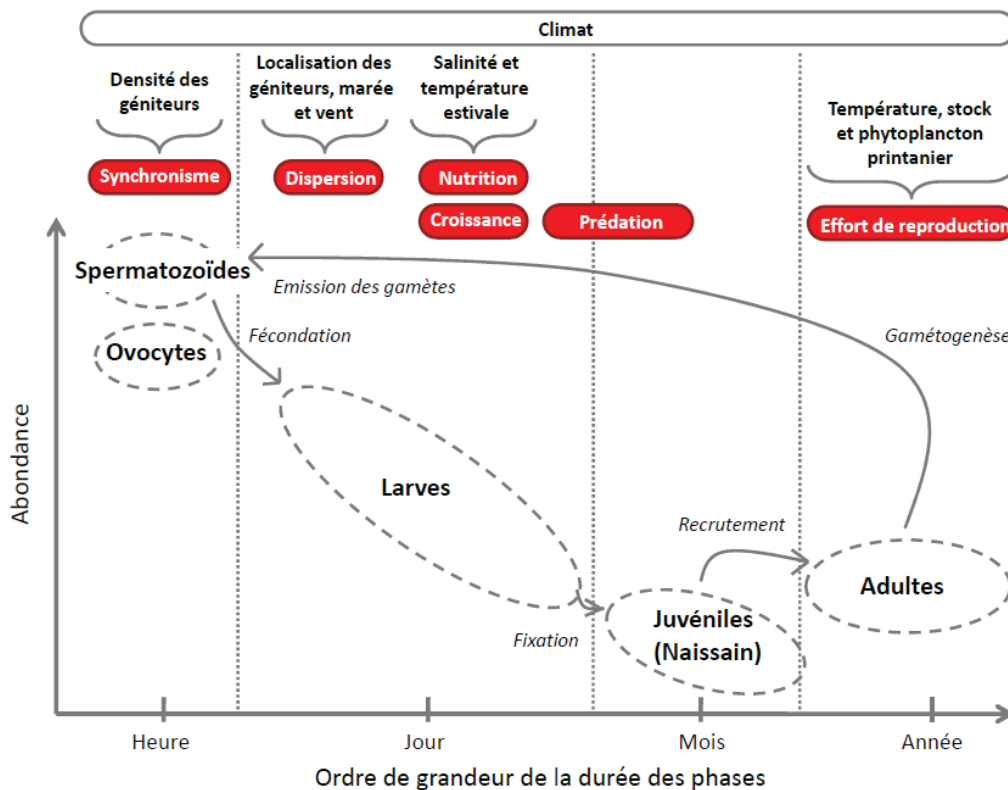


Figure 12 : Facteurs influençant les différentes phases de vie de l'huître représentées en fonction de l'abondance et la durée des phases de reproduction (Bernard., 2011)

#### Effort de reproduction

Pour pouvoir parler de recrutement, il faut remonter dans le cycle de développement d'une huître. En effet, il n'y aura pas de recrutement si aucun gamète n'est émis dans le milieu. Cependant, avant même l'émission de gamètes, il faut savoir que la quantité qui sera émise dépend, d'une part, des capacités physiologiques de l'individu, mais aussi du nombre d'individus présents dans la population; on parle de stock de géniteurs ou encore de densité des géniteurs (Bernard, 2011) (Figure 12). Plus ceux-ci seront nombreux, plus le nombre de gamètes émis sera élevé.

Vers mars-avril, la gamétogénèse redevient active. C'est alors que débute une accumulation de glucides. Ceux-ci seront par la suite transformés en lipides de réserves des gamètes. Les plus fortes

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

teneurs en lipides sont observées avant la première ponte (fin de printemps à début d'été), atteignant de 13 à 20 % du poids sec. Juste après la ponte, les teneurs en lipides représentent environ 6 % du poids sec (Bouchet et al., 1997). Une certaine quantité de gamètes seront émis dans le milieu extérieur (on parle d'effort de reproduction) : des ovocytes ou des spermatozoïdes. Les ovocytes émis auront une certaine taille initiale qui est en lien avec la teneur en lipides (Ben Kheder, 2007). Auby et Maurer en 2004 ont montré que l'effort de reproduction est conditionné par la richesse phytoplanctonique du milieu entre la fin de l'hiver et le printemps précédant les pontes. La quantité de nourriture serait donc un facteur explicatif d'un bon ou mauvais effort de reproduction et donc de la quantité de larves formées qui pourront se fixer. Mais à ceci s'ajoute le synchronisme des émissions de gamètes qui est un facteur important pouvant expliquer les variations de recrutement (His, 1976). En effet, au cours de son étude Edouard His remarqua que seules les pontes massives et de courte durée pouvaient aboutir à une bonne évolution des larves et qu'au contraire les frais partiels, étalés sur plusieurs jours se soldaient par la disparition très rapide des larves au stade véligère. Les températures estivales pourraient elles aussi influencer sur l'effort de reproduction des huîtres adultes (Figure 12). En effet, après la fin de la gamétogénèse, une température minimale est nécessaire pour permettre l'émission des gamètes (Castaños et al., 2009).

De ceci découle plusieurs enjeux : selon la richesse phytoplanctonique du milieu, l'effort de reproduction sera tel, qu'il y aura un nombre plus ou moins important de larves formées. Ces larves, en fonction des conditions du milieu, pourront croître et enrichir le stock d'huîtres adultes pour les étés suivants. Auby et Maurer en 2004 ont constaté que les années d'abondants captages sont caractérisées par des valeurs élevées du nombre de petites larves avec une importante survie. Au contraire, le nombre et la survie des larves sont particulièrement faibles pour toutes les pontes principales des années de très mauvais captage (1998 et 2002). Ceci est expliqué par le fait qu'une forte sélectivité se déroule dans les premières étapes de vie larvaire puisque les mortalités les plus importantes surviennent entre les stades de larves dites « petites » (P) (de 24h à 6 jours post fécondation) et « moyennes » (M) (de 10 à 15 jours post fécondation). Finalement la majeure partie de la variabilité de la survie totale des larves au stade de fixation par rapport au stade petites (F/P) est expliquée par les variations de M/P (Figure 13). Les années défavorables sont aussi des années marquées par des vents forts alliés à de faibles températures, pouvant influencer le synchronisme d'émission des gamètes et leur rencontre (Bernard, 2011).



## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

stades larvaires, c'est-à-dire jusqu'au stade larve D pour lequel peu d'études ont été réalisées jusqu'à présent sur cette espèce. Pourtant, le facteur thermique joue un rôle important notamment dans la vitesse de croissance des larves (Helm and Millican, 1977). La température idéale de développement des larves D de *Crassostrea gigas* est de 24 °C pendant 24 h (AFNOR, 2009; His et Seaman, 1993; Robert et His, 1981) .

En 1989, Edouard His a suivi l'impact de différentes températures (15 °C, 20 °C, 25 °C et 30 °C) sur l'huître creuse *Crassostrea gigas* ainsi que sur la moule *Mytilus galloprovincialis*. L'exposition aux différentes températures n'est réalisée que 24 heures après la fécondation, donc juste après l'obtention des larves D chez l'huître. A la température de 30 °C, il observe des comportements anormaux des larves (larves nageant rapidement avec des mouvements en spirale) et une augmentation de la mortalité supérieure à 70 % pour la moule. Au contraire, les larves d'huîtres au bout des 3, 5 ou 7 jours d'exposition n'ont pas montré d'effet de la température.

MacInnes et Calabrese en 1979 se sont intéressés à l'impact de ce paramètre en exposant des embryons de *Crassostrea virginica* à des températures de 20 °C, 25 °C et 30 °C pendant 48h après fécondation, afin d'observer les malformations sur les larves D obtenues. Les résultats ont montré qu'au-delà et en deçà d'une température de 25 °C, proche de la température optimale de développement des larves D, il y a augmentation du nombre d'anomalies. Mais la survie des larves ne s'en trouve pas affectée. Nous pouvons tout de même nous interroger sur le devenir de ces larves malformées.

Hrs-Brenko en 1981 a détecté d'importantes mortalités pour des larves d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea gigas* exposées à 30°C. Alors que MacInnes et Calabrese n'observaient pas d'effets létaux des hautes températures sur les larves D, à des stades plus avancés, la mortalité est supérieure.

Ceci étant, nous pouvons nous interroger sur l'impact de températures inférieures et supérieures à l'optimal de développement sur les stades très précoces (1h post-fécondation jusqu'au stade larve D) et si les malformations observées à ce stade peuvent influencer sur la survie à des stades ultérieurs et donc sur le recrutement.

En 2000, l'étude d'Auby et Maurer (2004) a montré que la faible survie des cohortes larvaires semble due à un déficit de phytoplancton, déficit pouvant-être lié à des concentrations en herbicides dans les eaux du Bassin un peu plus élevées que les autres étés. En effet, outre les facteurs environnementaux, ceux liés à l'activité anthropique ont aussi été évoqués. Les activités anthropiques au niveau du Bassin versant (agriculture) ou interne au bassin (nautisme et peintures antisalissure) sont sources de



molécules organiques et inorganiques, qui ont été identifiées comme susceptibles d'avoir un lien sur les variations de recrutement.

D'autres facteurs environnementaux tels que la salinité ont été proposés comme paramètres impactant la survie larvaire et donc le recrutement. MacInnes en Calabrese en 1979 ont montré qu'à une température de 25 °C, plus la salinité diminue (jusqu'à 17.5 u.s.i) plus le nombre d'anomalités larvaires au stade D de *Crassostrea virginica* augmente. Cependant d'après Edouard His (1989), seules de très faibles salinités (inférieures à 10 u.s.i) diminuent le développement normal des larves (His et al, 1989).

## 2.7. Intérêt écotoxicologique de l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas*

Les activités humaines sont responsables de l'introduction dans l'environnement de multiples substances d'origines industrielles, domestiques, urbaines ou agricoles (Ettajani and Amiard, 1995)(Amiard et Triquet., 2008). Suite à la dégradation de l'environnement, il apparaît nécessaire de se doter de méthodes permettant d'évaluer la toxicité à plus ou moins long terme des polluants sur les différents écosystèmes. Réceptacle final des apports en polluants, les écosystèmes aquatiques ont été les premiers systèmes d'élaboration et d'application de modèles écotoxicologiques d'évaluation d'impact (Bessi and ElAlami, 2009). Jusqu'à présent, dominait l'approche analytique, qui se limitait à déterminer les niveaux de contamination des biotopes par des polluants. Plusieurs éléments manquaient donc dans cette approche :

- absence d'information sur l'impact de ces polluants sur les organismes du milieu
- pas d'indication sur le synergisme ou l'antagonisme des différents polluants
- pas d'information sur les quantités bio disponibles ou bioaccumulées dans les organismes

L'approche écotoxicologique se veut donc complémentaire de l'approche analytique jusque-là utilisée. Dans cette approche ont été développés les bio-essais afin d'évaluer le potentiel toxique d'une substance ou d'un mélange par la mesure des réponses biologiques d'un organisme. Ces bio-essais présentent différentes caractéristiques : ils sont rapides et peu coûteux, ils reflètent la toxicité de la fraction biodisponible des contaminants, ils prennent en compte les éventuelles interactions entre composés, ils peuvent mettre en évidence la présence de contaminants non décelés par l'analyse chimique, ou que l'on ne sait pas doser, ils sont réalisés en milieu contrôlé, les effets de facteurs pouvant rendre l'interprétation difficile comme dans le milieu naturel, sont limités (Geffard, 2001).

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

Deux types de tests sont à distinguer selon le temps d'exposition plus ou moins important des organismes indicateurs : les tests de toxicité aiguë avec des temps d'exposition courts variant de quelques heures à quelques jours, et les tests de toxicité sub-chronique ou chronique avec des temps d'exposition plus longs pouvant se faire sur toute la durée de vie de l'organisme.

Les deux espèces les plus communément utilisées dans les bio-essais de toxicité aiguë sont *Crassostrea gigas* et *Mytilus spp.* afin d'évaluer la toxicité de polluants tels que les métaux (Beiras and His, 1995; Calabrese et al., 1973; Connor, 1972; Mai et al., 2012; Martin et al., 1981), les pesticides (Mai et al., 2014; Mottier et al., 2013; Robert and His, 1981), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Geffard et al., 2004, 2002), les médicaments (Di Poi et al., 2013) ou encore pour évaluer la qualité chimique des eaux ou de sédiments pollués (Chapman and Long, 1983; His et al., 1996; Quiniou et al., 2007). De plus, ce test est normalisé depuis 2009 (AFNOR T90-382).

L'avantage d'utiliser l'huître creuse japonaise provient de sa large répartition géographique et la possibilité de se procurer des géniteurs matures (soit d'écloserie ou provenant du site même d'étude) pendant une majeure partie de l'année (Quiniou et al., 1991). Les huîtres sont considérées comme des espèces sentinelles, bioindicatrices d'écosystèmes côtiers anthropisés, de par leurs facilités de manipulation, d'élevage en laboratoire et leur sensibilité à certains polluants (Geffard et al., 2002; His et al., 1999; Quiniou et al., 2007; Wessel et al., 2007). Certaines réponses biologiques de l'huître sont utilisées comme biomarqueurs afin de mesurer le degré de pollution environnemental de par leur capacité à bioaccumuler dans leurs tissus de fortes teneurs en contaminants par filtration de l'eau. De plus, leur sédentarité leur interdit toute possibilité de fuite face à une pollution chronique ou soudaine. De nombreuses études ont ainsi été menées sur *Crassostrea gigas* dont certaines sont listées dans le tableau 2. L'autre aspect non moins négligeable à l'utilisation de l'huître au cours du test embryon larvaire est représenté par l'obtention rapide de larves, puisqu'une fois fécondé, c'est au bout de 24h à 24 °C que l'œuf se transforme en larves D. La durée de cette phase a donc l'avantage d'être courte, permettant l'obtention d'une réponse rapide (Quiniou et al., 1991).

Cependant, la toxicité d'un polluant ainsi que l'impact des variations des facteurs environnementaux sur un organisme peuvent varier au cours des différents stades de vie de ce dernier (MacInnes and Calabrese, 1979). Les études antérieures ont montré que les premiers stades de vie des organismes invertébrés marins (embryons et larves) sont moins tolérants aux polluants que les adultes des mêmes espèces (Connor, 1972; Martin et al., 1981; Quiniou et al., 2005). Ces jeunes stades sont alors appelés stades critiques et peuvent servir pour les tests de toxicité.

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

Les embryons d'huîtres ne nécessitant pas d'apport de nourriture avant l'obtention des larves D, les larves étant dans une phase endotrophe, leur utilisation au cours du test embryo larvaire représente donc un intérêt tout particulier. La qualité de l'eau testée est le seul facteur extérieur responsable des effets observés sur les larves (Quiniou et al., 1991). Le tableau 3 rassemble les études récentes portant sur les anomalies de développement des larves d'huître exposées à différents contaminants.

Tableau 2 : Exemples d'études écotoxicologiques menées sur différents stades de l'huître

Contaminant	Stade	Effets étudiés	Référence
	<b>1 an</b>		
Cadmium		<u>Expression génétique</u> Augmentation du niveau des ARN Heat shock protein 90 (HSP90) et métallothionéine (MT)	Choi et al., 2008
Cadmium Zinc Cadmium+ Zinc	Diploïde et triploïde	<u>Expression des MT</u> Surexpression Pas d'effet Surexpression	Marie et al., 2006
	<b>3 ans</b>		
Zinc		<u>Expression génétique</u> Surexpression ARNm des MT	Mottin et al., 2012
Cadmium		<u>Survie, ploïdie</u> Diminution survie Augmentation aneuploïdie	Bouilly et al., 2006
	<b>Adultes</b>		
Cadmium Mercure		<u>Survie hémocyte, activité enzymatique</u> / Mortalité hémocyte Inhibition de l'activité des phénoloxydase- like	Gagnaire et al., 2006
Fluorène Pyrène		<u>Etude de la phagocytose</u> Diminution de l'activité	Bado-Nilles et al., 2008
Hydrocarbures		<u>Expression génétique</u> Augmentation du niveau des ARNm Cytochrome P4501A – like protein, cytochrome b5, flavin-containing mono oxygenase 2 and glutathione S-transferase omega class, copper/zinc superoxide dismutase, heat shock protein	Boutet et al., 2004
EDTA TBT		<u>Hémocyte</u> Altération de l'agrégation des hémocytes	Auffret et Oubella, 1997

Tableau 3 : Exemples d'études écotoxicologiques menées sur les larves d'huîtres

Contaminant	Stade	Etude	Effet	Référence
	<b>Larvaire</b>			
S-Métolachlore MESA MOA	Larves D	- Malformations larvaires - Dommages à l'ADN - Expression génétique	- - -	Mai et al., 2014
Cadmium Irgarol Métolachlore Cuivre	Larves D	- Malformations larvaires - Dommages à l'ADN	- - -	Mai et al., 2012
Cuivre Glyphosate Mercaptodiméthur  Dinoterbe	Larves D	- Malformations larvaires	- / / -	His et al., 1999
Diuron Glyphosate Roundup	Larves D	-Malformations larvaires	- / /	Akcha et al., 2012
HAP	Larves umbonnées	-Croissance	-	Geffard et al., 2002
Glyphosate AMPA Roundup Express Roundup Allées et Terrasses	Larves D et larves pédiveligères	- Malformations larvaires	- - - -	Mottier et al., 2013
$\beta$ -2-mercaptoethanol  Sodium diethyldithiocarbonate  Tropolone	6h à 13 jours	Spectrophotométrie : activité des phénoloxydases	-  - -	Thomas-Guyon et al., 2009
Mecoprop Mecoprop-p 2-méthyl-4-chlorophénol	Larves véligères	- Malformations larvaires	- - --	Mottier et al., 2014

(-) Effet négatif (/) Absence d'effet (+) Effet positif aux concentrations testées

### 3. Contexte climatique

Les écosystèmes côtiers, tels que le Bassin d'Arcachon, présentent une sensibilité prononcée à la variabilité climatique (Goberville et al., 2010). De par sa latitude et sa position à l'ouest du continent européen, le Bassin d'Arcachon appartient au domaine climatique tempéré de type océanique (Bouchet et al., 1997). Cependant, les écosystèmes côtiers au climat du type tempéré sont influencés par la dynamique locale des masses d'eau et les phénomènes climatiques à l'échelle annuelle (Goberville et al., 2010). Le GIEC, Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (2007) admet que le climat de la terre a évolué à l'échelle régionale et mondiale depuis l'époque préindustrielle. Depuis celle-ci, les activités humaines ont augmenté les concentrations de gaz à effet de serre dans l'atmosphère (le dioxyde de carbone, le méthane, l'oxyde nitreux, la vapeur d'eau, et l'ozone troposphérique). Le dioxyde de carbone est considéré comme étant le plus important gaz à effet de serre. Ses rejets ont augmenté de 80 % environ entre 1970 et 2004 (Bernstein et al., 2007). Cependant, le mécanisme d'effet de serre, bien qu'essentiel à la vie, peut devenir néfaste s'il est modifié artificiellement. Naturellement, il consiste en un piégeage d'une partie des rayons infrarouges, permettant à la terre d'avoir une température moyenne de 15 °C (et non de -18 °C si celui-ci n'opérait pas). Cependant, les rejets de gaz à effet de serre augmentent artificiellement le piégeage des rayonnements infrarouges entraînant une augmentation de la température à la surface de la terre et des océans (océan et climat fiche scientifique) (Maniez and Laug, 2009).

Le réchauffement du système climatique est sans équivoque. On note déjà, à l'échelle du globe, une hausse des températures moyennes de l'atmosphère et de l'océan. Chacune des trois dernières décennies a été plus chaude que toutes les précédentes ; la décennie des années 2000 ayant été la plus chaude. Les températures de surface combinant les terres émergées et les océans montrent une augmentation d'environ 0,85 °C [0,65 à 1,06] sur la période 1880-2012 et d'environ 0,72 °C [0,49 - 0,89] sur la période 1951-2012 (Hartmann et al., 2013). Une équipe de chercheurs du Groupe d'étude de l'atmosphère météorologique (GAME/CNRM, Météo-France / CNRS) et du CERFACS (Centre Européen de Recherche et de Formation Avancée en Calcul Scientifique) a développé une nouvelle méthode d'analyse statistique de l'impact des activités humaines sur le climat (Figure 14). Par comparaison entre les modélisations et les observations faites, l'association de forçages naturels et anthropiques expliquent le mieux les variations de températures. Ces résultats confirment l'importante responsabilité des activités humaines dans le réchauffement en cours.

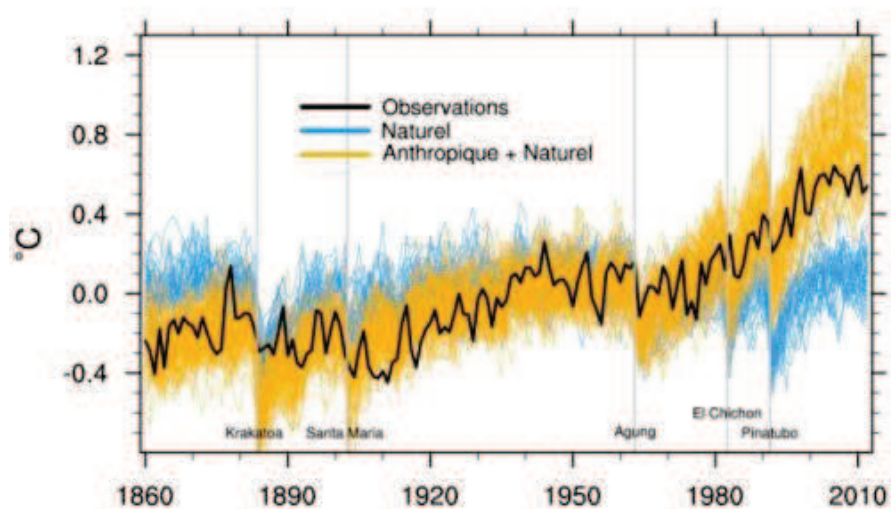


Figure 14 : Évolution de 1860 à 2012 de la température annuelle moyenne à la surface de la Terre par rapport à la température moyenne de cette période prise comme référence, observée (courbe noire) en prenant en compte soit tous des facteurs externes connus (courbes oranges), soit uniquement les facteurs naturels (courbes bleues). Les principales éruptions volcaniques sont indiquées par les barres verticales ([www.insu.cnrs.fr](http://www.insu.cnrs.fr))

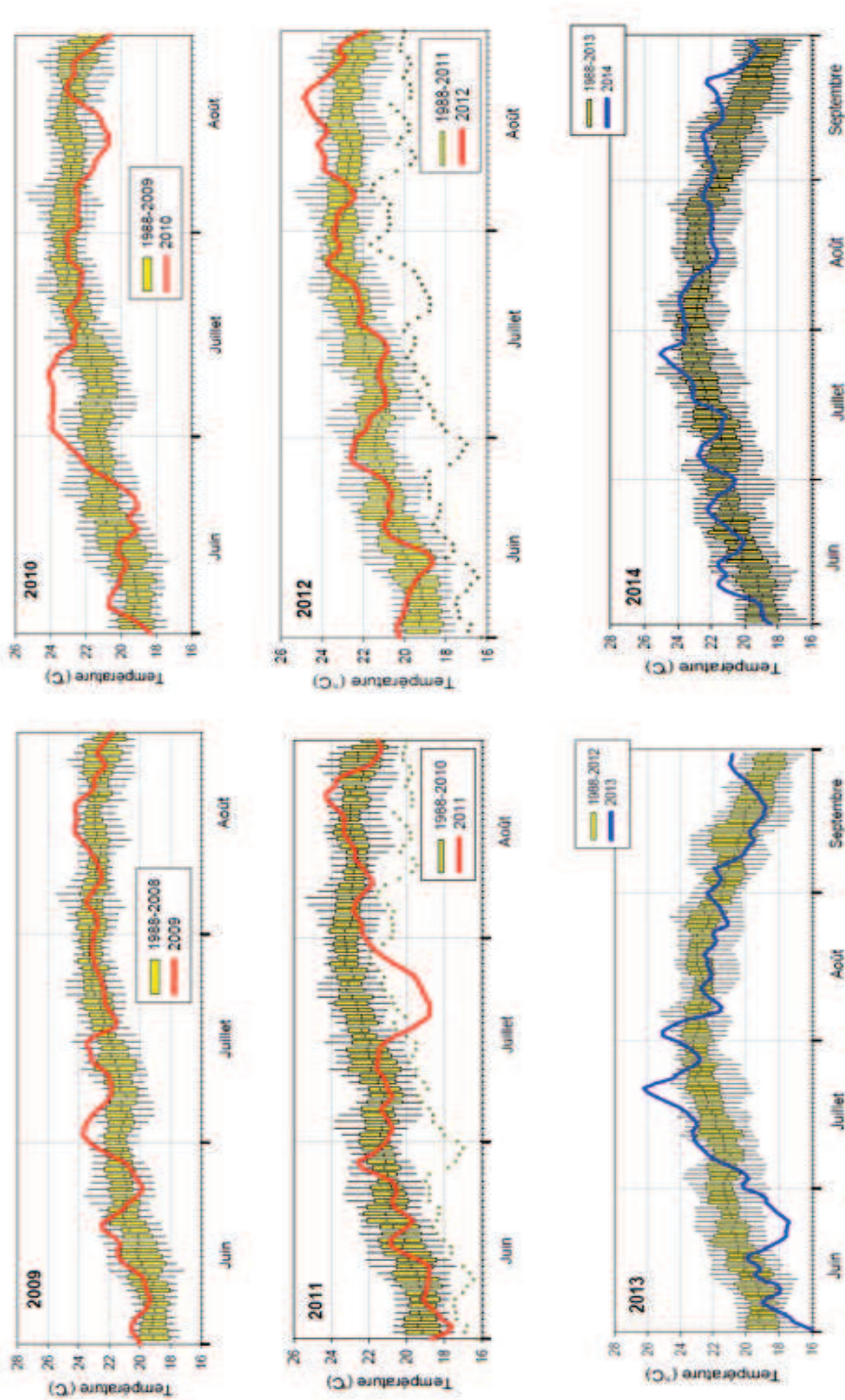


Figure 15 : Evolution journalière de la température de l'eau dans le chenal du Teychan à la jetée d'Eyrac (les triangles correspondant aux minima observés pendant la période 1988-2012) (Ifremer)

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

En ce qui concerne le Bassin d'Arcachon, des relevés de températures des eaux sont réalisés en continu à la jetée d'Eyrac dans le chenal du Teychan depuis de nombreuses années (Ifremer). En 2009, de façon majoritaire, la température de l'eau a présenté des valeurs normales ou élevées par rapport aux observations antérieures (Figure 15). En 2010 et 2011, la température de l'eau a été très variable sur la période estivale. L'été 2012 a été caractérisé par des températures de l'eau très variables, avec des valeurs conformes ou supérieures aux normales journalières pendant les trois mois. L'été 2013, période de nos premières campagnes d'échantillonnage, est caractérisé par des températures très froides de l'eau en juin et tout début juillet puis très élevées pendant les trois dernières semaines de juillet, la première semaine du mois d'août et la fin du mois de septembre (Figure 15). En 2014 l'été a été caractérisé par des températures de l'eau élevées en juin et septembre, début juillet et du 20 juillet au 10 août. La seconde moitié du mois d'août a été plus froide que la normale. Les saisons estivales sont donc marquées par de grande variabilité des températures des eaux de surface du bassin, si bien qu'il est difficile d'exprimer une tendance.

Cependant, dans le Bassin d'Arcachon, les températures de l'eau, bien que très variables au cours des mois, sont aussi différentes selon les masses d'eau étudiées. Bouchet (1968) a identifié selon un axe Est-Ouest trois masses d'eau représentatives du Bassin et caractérisées par des salinités et des températures différentes (Figure 16). C'est ainsi que sont rencontrées les eaux néritiques externes (ENE) dont la salinité varie peu annuellement (34-35 u.s.i) à cause de leur proximité avec l'océan et dont l'amplitude thermique annuelle moyenne est de 13°C (9 à 22 °C). Viennent ensuite les eaux néritiques moyennes (ENM), de volume variable, dont la salinité varie de 27 à 33 u.s.i avec une amplitude thermique annuelle moyenne de 17°C (6 à 23 °C). Enfin, sont rencontrées les eaux néritiques internes (ENI), soumises à des variations importantes de salinité (22 à 32 u.s.i) en lien notamment avec les apports d'eau douce liés aux tributaires et dont les températures sont comprises entre 1 et 25 °C selon la saison (amplitude thermique moyenne, 24 °C). Ces masses d'eau se déplacent au gré des marées vers l'ouest au jusant et vers l'est avec le flot.

La morphologie semi-fermée du Bassin limite les échanges avec l'océan. Les eaux les plus orientales du Bassin en particulier ont tendance à être beaucoup moins renouvelées par les eaux en provenance de l'océan, pénétrant à chaque marée. Il faut deux à trois fois plus de temps aux eaux néritiques internes pour se renouveler en comparaison des eaux proches de l'ouverture (Littaye et al., 2011) (Figure 16). En raison de ce gradient Ouest-Est d'éloignement à l'océan et de profondeur, les zones orientales du Bassin sont soumises à des variations de température de plus grande amplitude que les zones situées plus à l'ouest. Cette différence sera prise en compte au cours de nos expérimentations pour le choix des sites d'études et des températures testées.



## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

En effet face au changement climatique et aux variations de température, les poissons ont la capacité de se déplacer massivement, leur permettant ainsi de trouver en d'autres lieux de meilleures conditions de vie. L'huître, pour sa part, passe la majeure partie de sa vie fixée. Cependant au début de son cycle de vie, elle est pélagique. Les données récentes montrent une colonisation vers des latitudes plus au nord, illustrant les possibles difficultés des huîtres à tolérer le changement climatique. Depuis 2000, le processus de colonisation de l'espèce s'est accéléré, ses densités pouvant devenir importantes dans certaines régions françaises et européennes (Le Berre et al., 2009), comme les îles britanniques ou encore la baie de Bourgneuf (Cognie et al., 2006). Cette progression vers des latitudes plus au nord résulte essentiellement du réchauffement climatique ayant étendu les zones où la température de l'eau est adéquate pour déclencher des pontes (Cognie et al., 2006; Lejart, 2009).

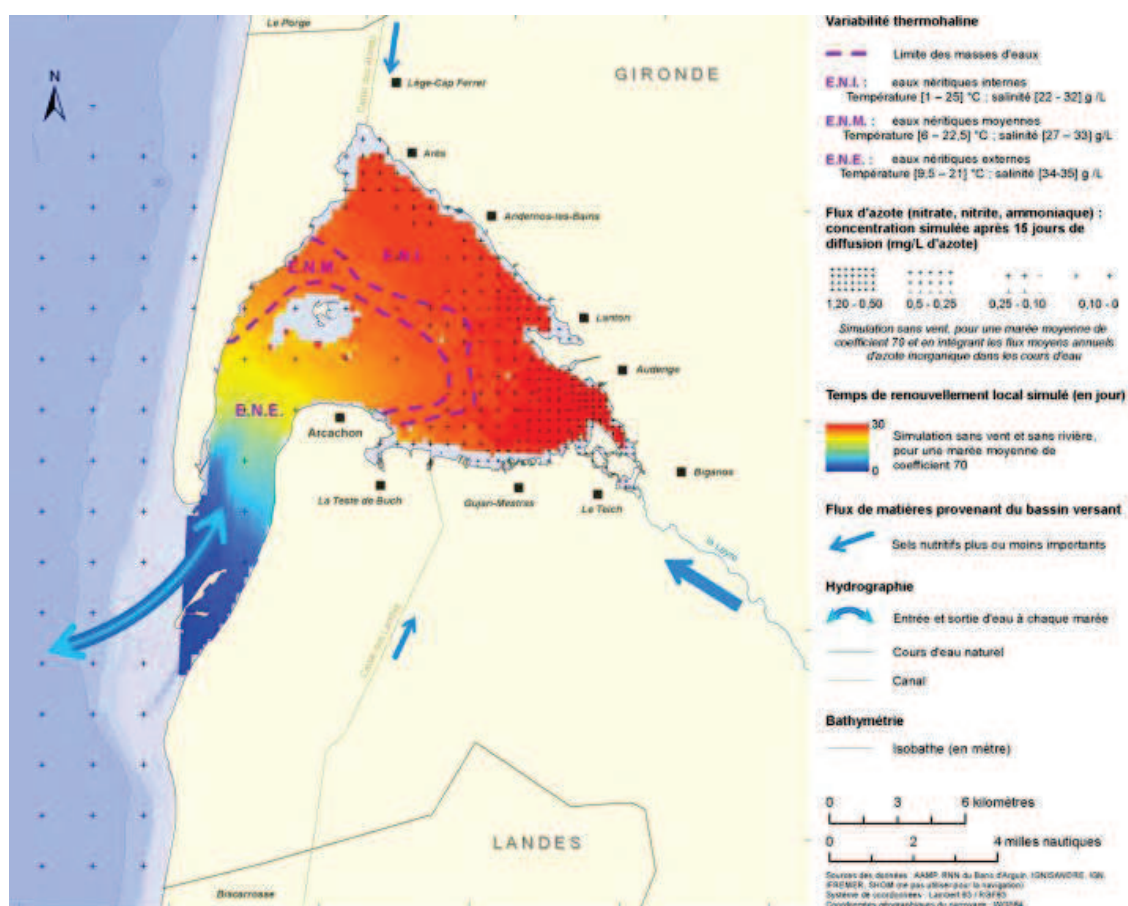


Figure 16 : Temps de renouvellement des eaux dans le Bassin d'Arcachon (Littaye et al., 2012)

Des études se sont intéressées à l'effet du changement climatique sur les organismes marins dont notamment les bivalves. Les effets de la température ou bien d'autres facteurs environnementaux ont ainsi été étudiés seuls ou couplés à d'autres paramètres environnementaux, comme la salinité ou le pH. De fortes variabilités dans les réponses sont observées selon l'espèce sur les stades larvaires.

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

Le facteur température, même s'il ne présente pas d'impact sur certaines espèces quand il est pris de manière isolée, peut avoir des effets lorsqu'il est couplé à d'autres facteurs comme les polluants (Tableau 4).

**Dans ce contexte de changement climatique global, un intérêt particulier est porté sur l'étude des phénomènes d'augmentation des températures pouvant impacter le développement larvaire de l'huître creuse japonaise. Cependant, le climat peut influencer fortement le milieu marin côtier et agir en synergie avec d'autres pressions anthropiques pour modifier l'état et le fonctionnement des systèmes biologiques et écologiques et les services qu'ils fournissent (Goberville et al., 2010). C'est pourquoi outre les changements des facteurs environnementaux climatiques, nous allons faire un état des lieux quant à la contamination du Bassin d'Arcachon en termes de polluants.**

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

Tableau 4 : Etudes écotoxicologiques de l'impact de la température couplé ou non à la salinité, au pH ou à la pCO<sub>2</sub> sur les stades larvaires de différentes espèces (\*Effet au-delà ou en deçà de la température optimale de développement de l'espèce sauf indication)

Paramètre	Valeurs	Espèce	Stade	Effet *	Publication
T° x salinité	15 à 30 °C 20 à 30 u.s.i	<i>Crassostrea gigas</i> <i>Mytilus galloprovincialis</i>	Larvaire (>24H)	/ Mortalité à 30°C	His et al., 1989
T° x salinité	20 °C, 25 °C, 30 °C 17,5 à 27,5 u.s.i	<i>Crassostrea virginica</i>	Larvaire	Augmentation malformations au-delà et en deçà de 25°C Augmentation malformations avec diminution salinité	MacInnes et Calabrese, 1979
T° x salinité	20 °C à 35 °C 25 à 40 u.s.i	<i>Pinctada margaritifera</i>	Larvaire	35°C mortalité Pas de développement à 20°C Croissance et survie minimal à 40 us.si	Doroudi et al., 1999
T° x salinité	20 °C, 25 °C, 30°C 10 à 40 u.s.i	<i>Crassostrea Rhizophorae</i>	Larvaire	Augmentation des malformations à 30°C Salinité idéale : de 25 à 37 u.s.i	Dos Santos et Nascimento, 1985
T°	30 °C	<i>Ostrea edulis</i>	Larvaire	Mortalité	Hrs-Brenko, 1981
pCO <sub>2</sub> x T°	375 à 1000 µatm 18 à 30 °C	<i>Saccostrea glomerata</i>  <i>Crassostrea gigas</i>	Larvaire Larvaire	Augmentation des malformations avec l'augmentation de pCO <sub>2</sub> quelle que soit la T° Augmentation de 53% à 18°C et 1000 µatm Augmentation de 40% à 30°C et 1000 µatm	Parker et al., 2010
pH	7.4 et 8.2	<i>Crassostrea gigas</i>	Larvaire	Seulement 5% de développement normal et calcification perturbée à ph 8,2	Kurihara et al., 2007
pH pH x salinité pHxsalinité xT°	7.9 ; 7.6 ; 7.4 à 34 u.s.i 27 u.s.i 24 °C et 30 °C	<i>Crassostrea angulata</i>	Larvaire	/ Diminution taille coquille à pH 7.4 Surface coquillère affectée à 30°C et 27 u.s.i à pH=7.4	Thiyagarajan et Ko, 2012
pH	Δ -0.3 e -0.6	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Juvénile	/	Range et al., 2012

#### 4. Contexte de contamination : les polluants

L'étude de la contamination du Bassin d'Arcachon a été réalisée au cours de nombreux travaux antérieurs. Les contaminants métalliques et certains contaminants organiques dans les mollusques sont suivis depuis de nombreuses années dans le cadre du réseau Ifremer RNO (devenu ROCCH en 2008). Les molécules phytosanitaires présentes dans le bassin d'Arcachon sont suivies dans le cadre des réseaux SURGIBA, ASCOBAR, OSQUAR et REPAR, mais aussi depuis une dizaine d'années par l'IFREMER (Auby and Maurer, 2004b; Auby et al., 2011, 2007). La présence de nombreux contaminants tels que des insecticides et des herbicides ont été détectés aussi bien dans la colonne d'eau que dans les huîtres au cours des années 2005 et 2006 (Auby et al., 2007). Le programme SURGIBA a permis de mettre en évidence la présence d'un certain nombre de molécules phytosanitaires, principalement des herbicides et des molécules « anti-salissures ». L'effort de recherche sur ces derniers contaminants s'est considérablement accru depuis quelques années, avec la mise en œuvre du programme ASCOBAR (Apports scientifiques face à la problématique conchylicole du Bassin d'Arcachon -2008 à 2010), du programme OSQUAR (2010 à 2015) et du réseau de surveillance des pesticides sur le Bassin d'Arcachon REPAR depuis 2010. Ces études ont permis de mettre en évidence la présence d'un certain nombre de molécules phytosanitaires, principalement des herbicides et des molécules « anti-salissures », en concentration notable (Acétochlore, acétochlore OA, acétochlore ESA, métolachlore, métolachlore OA, métolachlore ESA, alachlore, diuron, atrazine 2-hydroxy, irgarol ...). L'agriculture a été identifiée comme la source principale d'apport en pesticides dans le Bassin, bien qu'une source domestique soit aussi évoquée (Budzinski et al., 2011). La deuxième source clairement identifiée est interne au Bassin. Il s'agit des activités nautiques qui contribuent, à travers l'utilisation de peintures anti-salissures, à l'apport de différentes molécules telles que des biocides (irgarol, diuron) et des métaux comme le cuivre.

Les organismes aquatiques peuvent accumuler des métaux ou des pesticides présents dans la colonne d'eau ou par ingestion de nourriture contaminée (Hung et al., 2001). La contamination par les métaux ou les pesticides est rencontrée dans de nombreux pays à travers le monde. C'est pourquoi le besoin de comprendre et d'évaluer la toxicité de ces molécules sur les organismes aquatiques est très important. De nombreuses études s'intéressent aux effets des polluants sur les invertébrés marins tels que l'oursin (Manzo et al., 2013; Pesando et al., 2004), les polychètes (Geracitano et al., 2004; Ventura-Lima et al., 2007), les crustacés (Kumar et al., 2010; Lahman et al., 2015).

## 4.1. Les contaminants métalliques

### 4.1.1. Généralité

Les métaux sont des composants naturels constituant l'écorce terrestre. Leur présence dans les écosystèmes est ainsi liée à leur abondance naturelle dans la croûte terrestre, où ils sont généralement présents sous la forme de minerais, ainsi qu'aux rejets dus à l'anthropisation. Leur utilisation est multiple depuis le nickel ou le cadmium des batteries d'accumulateurs, au chrome des aciers inoxydables, ou au cuivre de l'industrie électrique etc.

Pendant longtemps, le terme de « métaux lourds » était employé pour désigner ces éléments métalliques naturels. Cependant, ce terme fut qualifié de « meaningless term » en 2002 par Duffus, c'est-à-dire vide de sens, de par son manque de définition scientifique concrète et valide. En effet certains métaux toxiques ne sont pas vraiment « lourds » et à contrario certains éléments toxiques ne sont pas des métaux. Pour ces raisons, l'appellation d'Elément Traces Métalliques – ETM est préférentiellement utilisée (Burnol et al., 2006).

Ces éléments traces métalliques présentent une toxicité variable en fonction de leur nature et de leur voie de pénétration. La première façon pour un organisme aquatique d'accumuler un métal de son milieu environnant est la pénétration de ce dernier à travers les membranes de l'organisme. Pour cela différents mécanismes, largement détaillés dans la littérature, sont proposés : (1) la diffusion simple, (2) la diffusion facilitée, (3) le transport actif (Mason, 2013) (Figure 17). Un dernier mode consisterait en (4) la pinocytose.

- (1) La diffusion simple est le transfert d'une substance, ici d'un contaminant, à travers la bicouche de phosphoglycérolipides d'une membrane de la région où elle est la plus concentrée vers la région où elle est la moins concentrée, c'est-à-dire selon le gradient de concentration, ne nécessitant aucune énergie.
- (2) La diffusion facilitée permet le transport à l'intérieur de la cellule de composés chargés qui ne pourraient pas traverser la membrane phospholipidique. C'est à l'aide de protéines de transport, de types canaux ou pores, que se fait ce processus, sans toutefois consommer de l'énergie et en allant toujours dans le sens du gradient de concentration. Ces protéines sont spécifiques à leur substrat, mais leur conformation peut provoquer l'internalisation d'ions ou de complexes métalliques proches en termes de taille ou de structure, du substrat originel.
- (3) Le transport actif correspond à l'internalisation du soluté dans le sens contraire du gradient de concentration à l'aide de protéines spécifiques enchâssées dans la membrane. Pour cela, la cellule doit dépenser de l'énergie et consomme alors de l'ATP. Ce dernier cède son

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

groupement phosphate terminal à la protéine, entraînant un changement de conformation de celle-ci, permettant alors le transport de l'ion métallique de l'autre côté de la membrane par transport uniport, symport ou antiport. Ces protéines sont dites ATPase (ex :  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase) et les contaminants peuvent interagir avec elles sous leur forme ionique ou complexés.

- (4) La pinocytose est une forme spécialisée de transport limitée aux grosses molécules ou aux particules insolubles. Ce mécanisme implique un processus d'invagination de la membrane cellulaire et la formation de vésicules contenant par conséquent du milieu extracellulaire.

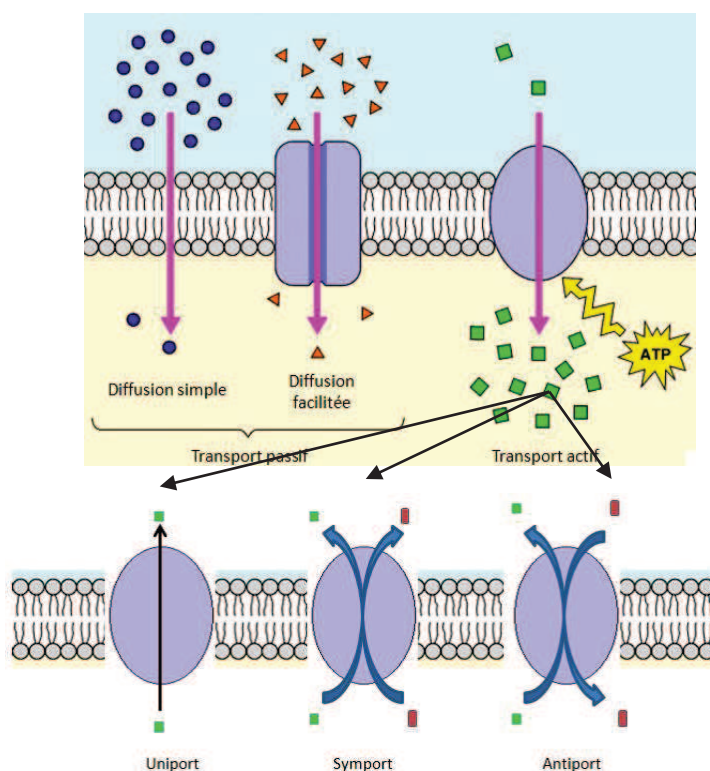


Figure 17 : Voies d'entrée des contaminants dans les cellules (adapté de Campbell et Reece, 2004)

Une fois la membrane traversée, les éléments traces métalliques peuvent être nécessaires à des fonctions cellulaires : on parle alors de métaux essentiels. C'est le cas du cuivre qui est impliqué dans de nombreuses voies métaboliques chez l'homme comme chez les animaux : composition de certains pigments hémolympatiques des mollusques tel que l'hémocyanine (Devier, 2003), cœur catalytique de certaines enzymes et metalloprotéines de structure (OMS IPCS, 1998). Le fer est présent dans l'hémoglobine pour le transport de l'oxygène (Legoff and Bonnomet, 2004). Le zinc est nécessaire au fonctionnement des déshydrogénases, aldolases, isomérases, transphosphorylases, ARN et ADN polymérases, anhydrase carbonique, Cu-Zn superoxyde dismutase (et autres)(Legoff and Bonnomet, 2004). D'autres métaux sont également essentiels : le manganèse, le sélénium, le vanadium, le molybdène, le cobalt, le chrome, etc.

#### 4.1.2. Le cuivre

Le cuivre est un métal naturellement présent dans la croûte terrestre dont la composition moyenne serait comprise entre 45 et 70 mg/kg (Baize, 1997; Rollin and Quiot, 2006). Généralement on le trouve dans les sulfures tels que la chalcopryrite ( $\text{CuFeS}_2$ ), la covelline ( $\text{CuS}$ ), la chalcosine ou chalcocite ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) ou la cuprite ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ). Deuxième meilleur conducteur de l'électricité après l'argent, il est utilisé dans toute l'industrie de la construction électrique et des composants électroniques. De plus, le cuivre est le métal usuel conduisant le mieux la chaleur. Cette propriété est utilisée pour chauffer ou refroidir rapidement un liquide ou un gaz (chaudières, radiateurs, condenseurs et réchauffeurs des centrales électriques, thermiques, nucléaires). Ces autres propriétés physiques sont nombreuses : résistance à la corrosion, malléabilité et plasticité, soudabilité. On comprend alors aisément pourquoi ce matériau est très fortement employé par l'Homme pour de multiples utilisations de la vie courante sous différentes formes. Parmi celles-ci, le cuivre compose les catalyseurs, certains fongicides ou insecticides utilisés en agriculture sous la forme d'acétate de cuivre, sous forme d'oxyde cuivrique il est utilisé pour protéger le carénage des bateaux via les peintures antisalissure, sous forme de chlorure cuivrique il entre dans la composition des désodorisants. Sous forme de sulfate de cuivre, il est notamment employé comme antifongique dans la bouillie bordelaise. Ce sont les ions cuivre libre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) qui vont affecter des enzymes présentes dans les spores de champignons, parasites des plantes des jardins, de manière à empêcher leur germination.

Ainsi, les apports anthropiques de cuivre peuvent provenir de sources agricoles (fongicide agricole, traitement fongicide des vignes et verger, bactéricides, herbicides), de sources industrielles (industrie métallurgique, industrie du bois) ou de sources urbaines (incinération des ordures ménagères, boues de stations d'épuration). Le milieu le plus exposé au cuivre reste le sol où 97% du cuivre libéré dans l'environnement s'y retrouve piégé contre 3% dans les eaux (et 0,04% dans l'atmosphère)(Dorsey et al., 2004). Sa présence dans les eaux dépend en majeure partie de l'érosion des sols par les cours d'eau, de son utilisation en tant que pesticide en agriculture sous forme de sulfate de cuivre ou encore des rejets d'eaux usées pouvant encore contenir des traces de cuivre après traitement (Bisson et al., 2005).

##### 4.1.2.1. Toxicité du cuivre

La biodisponibilité du cuivre va dépendre du compartiment considéré. En milieu aqueux, les caractéristiques physico-chimiques du milieu (pH, potentiel redox, type de sédiments, dureté de l'eau, contenu organique) (Flemming and Trevors, 1989a), influencent sa spéciation et donc sa biodisponibilité. On peut ainsi le retrouver sous diverses formes : ion libre  $\text{Cu}^+$ , néanmoins instable dans l'eau ou  $\text{Cu}^{2+}$ , pouvant former de nombreux complexes stables avec des ligands minéraux (Bisson et al., 2005). Mais il peut aussi se complexer avec des ligands organiques (surtout sur les groupes  $-\text{NH}_2$

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

et -SH, et dans une moindre mesure sur le groupe -OH) s'adsorbent sur des oxydes métalliques, des argiles ou des matières organiques particulaires (Dameron and Howe, 1998; Dorsey et al., 2004). Bien qu'étant un métal essentiel pour les organismes vivants, il peut toutefois devenir toxique au-dessus d'une certaine concentration, dépendant de l'organisme (Flemming et Trevors, 1989). La sensibilité au cuivre des poissons et des invertébrés aquatiques dépend de leur surface d'échange, de la fréquence respiratoire, et du débit de filtration au niveau des branchies. Plus ces paramètres augmentent, plus l'absorption du cuivre est facilitée (Hodson et al., 1979). Chez l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas*, une toxicité avérée a été constatée sur le développement larvaire dès  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cuivre (Mai et al., 2012) et sur l'embryogenèse au-dessus de  $25 \mu\text{g.L}^{-1}$  (His and Robert, 1982). Une augmentation dramatique du développement anormal des larves de la moule *Mytilus trossulus* a été constatée après une exposition à des concentrations excédant les  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cuivre (Fitzpatrick et al., 2008). Au-dessus de  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ , le développement des larves de l'oursin *Paracentrotus lividus* se retrouve affecté (His et al., 1999). Une étude menée sur l'oursin *Diadema setosum* a démontré un impact du cuivre dès les premiers clivages de l'œuf, soit 1 h après la fécondation pour une  $\text{EC}_{50}$  de  $0,00001 \mu\text{g.L}^{-1}$  et une  $\text{EC}_{50}$  de  $0,00004 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le stade larvaire pluteus (Ramachandran et al., 1997). Des effets sur la survie ou le bon développement des larves ont été observés après 48h d'exposition dès  $0,00008 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le crabe de boue *Scylla seratta* (Ramachandran et al., 1997). Les polypes de la méduse *Aurelia aurita* ne tolèrent pas plus de  $200 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cuivre, concentration entraînant rapidement des mortalités. La capacité à obtenir des larves D normales a également été testée chez la palourde *Ruditapes decussatus* et la moule *Mytilus galloprovincialis*. Des  $\text{EC}_{50}$  respectives de  $9,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  et de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  ont été obtenues (Beiras and Albentosa, 2004). L'effet du cuivre a également été testé à travers le succès de fécondation du polychète *Galeolaria caespitosa*. De fortes réductions dans le succès de la fécondation ont été observées de  $25$  à  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cuivre (Hollows et al., 2007). Des effets indésirables du cuivre ont été observés sur la fertilisation du bivalve *Isognomon californicum* suite à des expositions des gamètes à  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$  ou plus. Des effets négatifs importants sur le développement des larves véligères de cette espèce ont été observés à des concentrations beaucoup plus faibles de  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ . La réponse au cuivre des invertébrés varie donc considérablement d'une espèce à l'autre (Flemming and Trevors, 1989a).

### 4.1.2.2. Le cuivre dans le Bassin d'Arcachon

Dans l'environnement aquatique, le cuivre est trouvé sous diverses formes : de l'ion libre ( $\text{Cu}^+$  et  $\text{Cu}^{2+}$ ), à des formes complexées (complexation avec des ligands organiques ou minéraux). La majeure partie du cuivre rejeté dans l'eau se trouve sous la forme particulaire (Dorsey et al., 2004). Cependant, dans le Bassin d'Arcachon, les concentrations en cuivre dissout ont augmenté dans les eaux vers 1982, après l'interdiction de l'utilisation du Tributylétain (TBT) en tant que composant des peintures antifouling. Ces peintures, destinées à empêcher la fixation d'organismes vivants sur les carènes des bateaux sont



## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

utilisées pour des raisons de sécurité (manœuvre facilitée, allègement du bateau) mais aussi pour des raisons économiques (réduire la consommation de carburant) (Ifremer, 2008). Elles sont constituées d'un mélange complexe de quatre composés : des biocides, des liants, des solvants et des adjuvants. Les biocides, étymologiquement issu du latin *bio* et *cide* signifiant « *qui tue la vie* », doivent porter leur action de façon très large dès de faible concentration pour être un maximum efficace. Le TBT présente ainsi ces propriétés. Cependant, il a été jugé comme extrêmement toxique vis-à-vis des espèces marines, et fut progressivement interdit. En France, dès 1981, pour les bateaux de moins de 25 m, puis une interdiction au niveau mondial fut instaurée le 1<sup>er</sup> janvier 2003 (exception faite de la marine nationale). D'autres composés lui ont été substitués, comme l'oxyde cuivreux ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) insoluble dans l'eau. Ainsi, une fois dans le milieu, la biodisponibilité du cuivre pour les organismes aquatiques va dépendre de sa spéciation (notamment adsorption sur des matières organiques particulaires), liée aux caractéristiques physiques et chimiques du milieu.

L'utilisation du cuivre comme constituant de la plupart des peintures antifouling depuis l'interdiction du TBT entraîne une progression forte de ce contaminant métallique dans le Bassin d'Arcachon (Claisse and Alzieu, 1993). Cette progression des concentrations est particulièrement forte pour les points de suivi situés à l'intérieur du Bassin d'Arcachon, comme Comprian. Auby et Maurer en 2004 avait conclu que les concentrations de cuivre atteintes restaient inférieures aux seuils de toxicité pour les diatomées et les larves. Cependant, comme le précise le rapport Féliba publié en 2013, ces conclusions sont peut-être à revoir. En effet de récentes publications ont montré un effet du cuivre à des concentrations de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , c'est-à-dire des concentrations retrouvées dans les eaux du Bassin (Auby and Maurer, 2004b), sur les larves d'huîtres mais aussi sur les spermatozoïdes de l'huître creuse (Mai et al., 2014). Ces concentrations sont élevées par rapport aux concentrations naturelles de cuivre qui sont généralement comprises entre 0,03 et 0,23  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour l'eau de mer de surface (Srinivasan and Swain, 2007) et entre 0,001 à 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans les eaux océaniques ouvertes (Davaranah and Guilhermino, 2015). Cependant, les niveaux de cuivre du Bassin d'Arcachon sont relativement bas par rapport aux autres systèmes aquatiques équivalents à travers le monde (Tableau 5).

Tableau 5 : Contamination en cuivre de différents sites dans le monde

Lieu échantillonné	Année	Concentration (ng.L <sup>-1</sup> )	Références
<b>Crane Creek , Indian River Lagoon Florida</b>	1997	5700	BCI Engineering and Scientists Inc 2001
<b>Lagune de Venise (Nord et centre)</b>	2000-2003	<10	Gieskes et al., 2015
<b>Nord du golf de Gascogne</b>	2001	0,11 à 0,51	Waeles et al., 2009
<b>Baie du Massachussetts</b>	1989 à 1991	0,08 à 0,44	Shine et Wallace, 1995
<b>Baie de San Francisco</b>	1993 à 2001	0,41 à 2,76	Buck et al., 2007

Dans le Bassin d’Arcachon, les teneurs en cuivre dans les huîtres du Bassin ne cessent d’augmenter, atteignant ces dernières années des concentrations de l’ordre de 400 mg.kg<sup>-1</sup> de poids sec (Ifremer 2014). Les mesures des concentrations en cuivre bioaccumulé dans les huîtres en trois points du Bassin d’Arcachon (Figure 18) montrent la présence d’un gradient avec l’éloignement par rapport à l’océan. Les huîtres du Cap Ferret, plus proches de l’ouverture sur l’océan et donc, dans des eaux soumises à dilution, bioaccumulent moins de cuivre que les huîtres situées sur les sites les plus internes au Bassin (Les Jacquets et Comprian).

Le rapport annuel du RNO a suivi la contamination du cuivre dans les huîtres en la comparant à la médiane nationale (Figure 19). Les plus fortes concentrations sont observées en Gironde (jusqu’à 7,26 fois la médiane nationale), puis sur le bassin de Marennes-Oléron (x 3,02 au site « Palles »), La Rochelle présentant également de forts niveaux de contamination jusqu’à 5,26 fois la médiane nationale au site "Escalier Gaillard"). La Seudre amont présente une forte contamination par le cuivre (x 2,63 au site « L’Eguille »). Le bassin d’Arcachon et la Nivelle à Saint-Jean-de-Luz apparaissent sur la carte dans la classe de 2 à 4 fois la médiane. Sur la côte Atlantique une grande disparité des valeurs de bioaccumulation en cuivre est donc observée (Tableau 6).

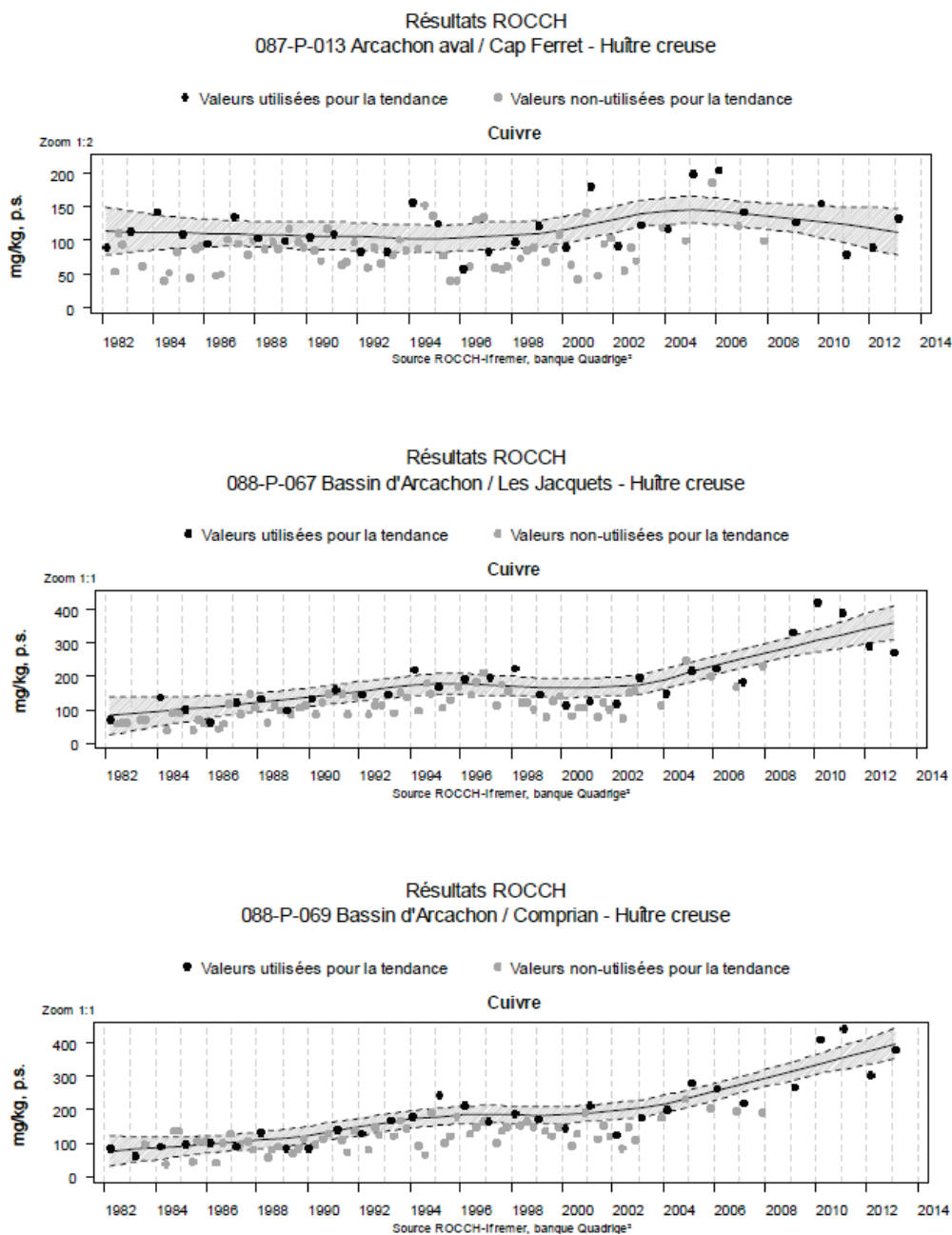


Figure 18: Concentrations en cuivre (mg.kg<sup>-1</sup>) dans les huîtres du Bassin d'Arcachon en trois points du Bassin d'Arcachon sur la période 1982 – 2014 (Ifremer, 2014)

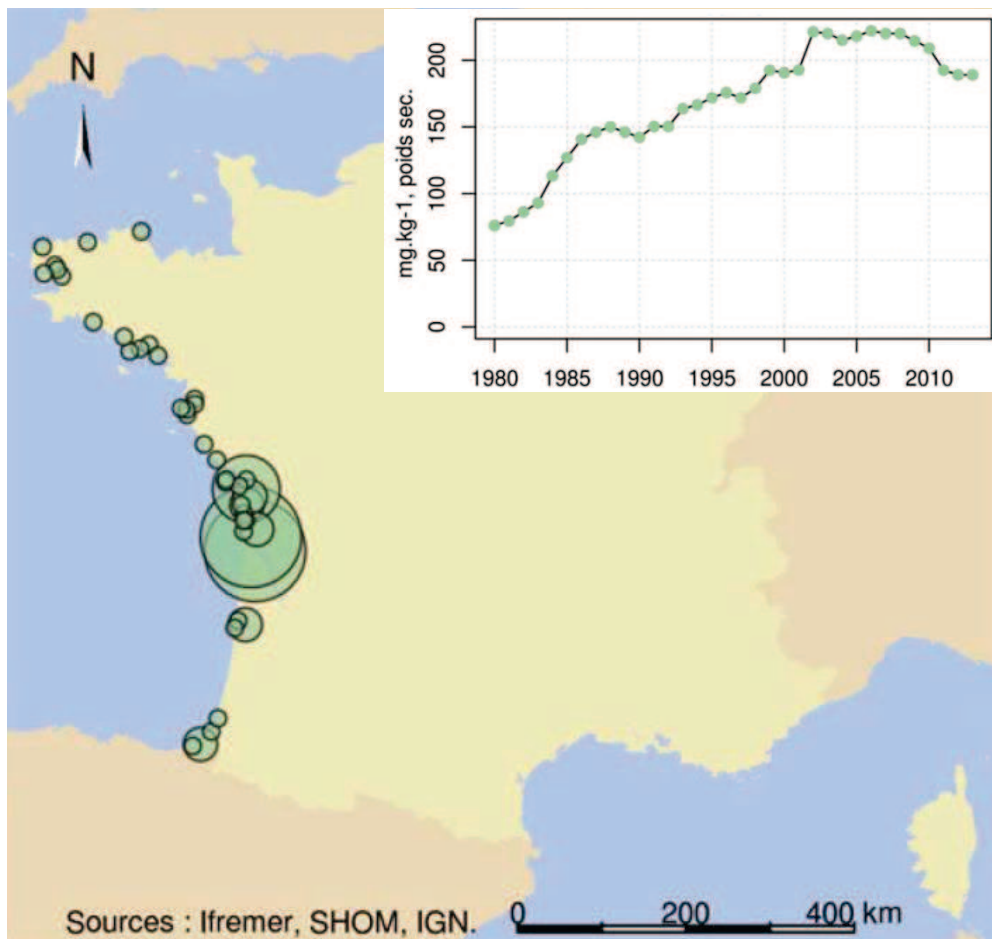


Figure 19 : Comparaison des médianes des concentrations en cuivre par point de prélèvement aux médianes nationales (représentées par la courbe) pour les cinq dernières années. Quatre classes ont été identifiées : la première, de 0 à 2 fois la médiane nationale, correspondant à des sites sans contamination particulière ; la dernière, plus de 6 fois la médiane nationale, correspondant à des sites particulièrement contaminés par le cuivre

Tableau 6 : Médianes des concentrations (mg.kg<sup>-1</sup> de poids sec) par rapport à la médiane nationale en différents points de relevés sur la côte Atlantique en France

Site	Médianes des concentrations (mg.kg <sup>-1</sup> poids sec)	Rapport de la médiane locale à la médiane nationale
Hendaye –Chingoudy	341.5	1.66
Ciboure-La Nivelle	394	1.91
Adour marégraphe	281.5	1.37
Cap-Ferret	123	0.60
Comprian	204.5	0.99
Les Jacquets	200.5	0.97
La Fosse	978	4.75
Pontailiac	771.5	3.75
Bonne Anse-Palmyre	551	2.67
Mus de Loup	262	1.27
Dagnas	309	1.50
Boyardville	280.5	1.36
Les Palles	499.5	2.42
Chatelaillon	335.5	1.63
Rivedoux	235.5	1.14
Baie de l'Aiguillon	202.5	0.98
Talmont	104	0.50
Noirmoutier-Gresse Loup	143.5	0.70
Bourgneuf-Coupelasse	348.5	1.87
Roguedas	167	0.81
Le Guiluin	105	0.51
Riec sur Belon	65.4	0.32
Aulne rive droite	223	1.08
Persuel	95.75	0.46
Rossermur	164	0.80
Le Passage	127	0.62
Aber Benoit	45.35	0.22
Pen al Lann	56.35	0.27

#### 4.1.2.3. Réglementation

La toxicité du cuivre en milieu marin est fonction de sa forme chimique et son état d'oxydation. Il n'existe pas, contrairement au plomb, au cadmium et au mercure, de valeur seuil de concentration dans les coquillages fixée par l'Union Européenne. Cette dernière a cependant fixé des seuils pour la qualité des eaux de consommation, seuil fixé à 2 mg.L<sup>-1</sup> de cuivre. La France est en accord avec ce seuil suite au décret du 20 décembre 2001 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles (Bisson et al., 2005). Afin d'évaluer la toxicité de cette substance, les études antérieures ont permis de déterminer la plus forte concentration sans risque pour l'environnement (PNEC). Dans les eaux marines, l'INERIS a estimé une PNEC de 0.8 µg.L<sup>-1</sup>.

## 4.2. Les contaminants organiques de type pesticide

### 4.2.1. Généralités

Les premiers pesticides de synthèse sont apparus sur le marché dans les années 1940. Leur but était d'augmenter les rendements agricoles (Van der Werf, 1996). A ce jour, ce type de molécule est encore largement utilisé. En 1996, Van der Werf publia une étude sur l'évaluation de l'impact des pesticides sur l'environnement. Dans celle-ci, il décrit l'ensemble des processus pouvant conduire à une contamination de l'environnement par les produits phytosanitaires. L'ensemble de ces processus a été repris, détaillé, et complété en 1999 et 2003 par le Bureau de recherches géologiques et minières (BRGM) pour son étude sur la pollution des eaux par les pesticides à l'échelle d'un bassin hydrogéologique. C'est pourquoi, sauf citation, l'ensemble des données recueillies ci-dessous est issu de ces deux études.

Les produits phytosanitaires comprennent une large gamme de molécules appliquées sous la forme de liquides, pulvérisés directement sur la plante ou sur le sol, ou appliqués sous la forme de granulés. Cependant, par pulvérisation, 1 à 50 % des produits peuvent être entraînés par les vents, pourcentage dépendant de la technique d'application utilisée et des conditions météorologiques. De nombreux pesticides sont retrouvés dans les eaux des zones estuariennes et des zones côtières (Tableau 7).

Tableau 7 : Structure des pesticides fréquemment retrouvés dans les eaux du Bassin d'Arcachon

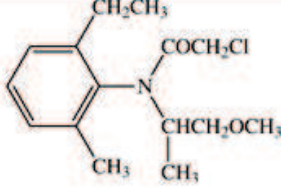
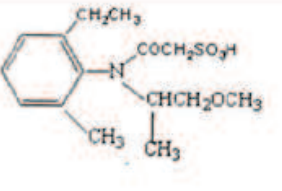
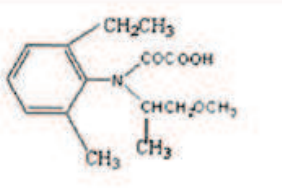
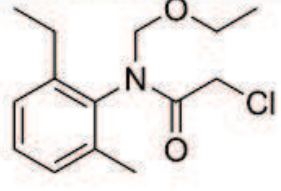
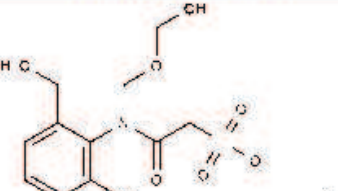
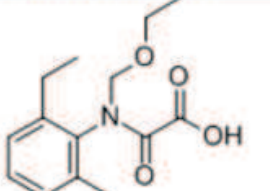
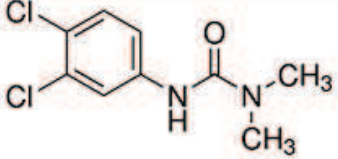
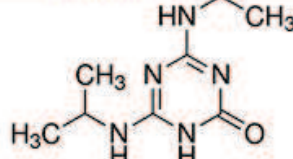
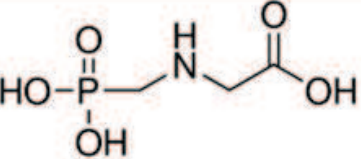
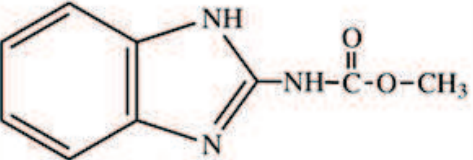
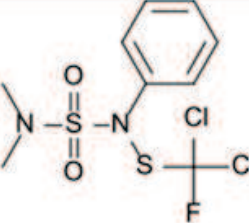
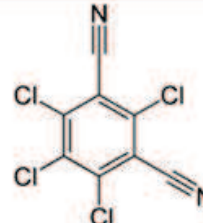
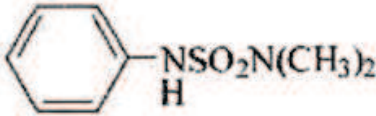
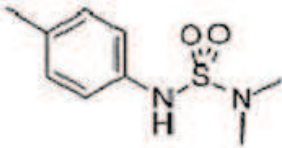
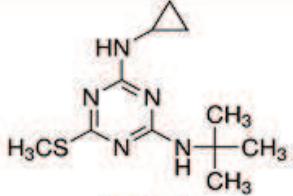
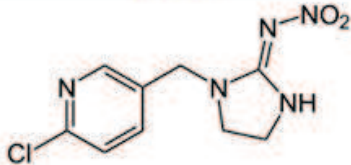
<b><u>Herbicide</u></b>	 <p>Métolachlore</p>	 <p>Métolachlore ESA</p>	 <p>Métolachlore OA</p>
	 <p>Acétochlore</p>	 <p>Acétochlore ESA</p>	 <p>Acétochlore OA</p>
	 <p>Diuron</p>	 <p>Atrazine 2-hydroxy</p>	 <p>Glyphosate</p>
<b><u>Fongicide</u></b>	 <p>Carbendazime</p>	 <p>Dichlofluanide</p>	 <p>Chlorotalonil</p>

Tableau 8 (suite) : Structure des pesticides fréquemment retrouvés dans les eaux du Bassin d'Arcachon

<b><u>Antifouling</u></b>	 <p style="text-align: center;">DMSA</p>	 <p style="text-align: center;">DMST</p>	 <p style="text-align: center;">Irgarol</p>
<b><u>Insecticide</u></b>	 <p style="text-align: center;">Imidachlopride</p>		



## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

Les processus contrôlant la contamination de ces eaux sont regroupés en quatre grands volets : la volatilisation dans l'atmosphère des produits puis leurs retombées sur les sols par les pluies ; l'adsorption/désorption sur les composés organiques et minéraux du sol ; la dégradation physico-chimique et biologique ainsi que le transport par l'eau par ruissellement et infiltration.

### **4.2.1.1. Volatilisation**

Au moment de l'application et selon la méthode employée, une partie des produits peut être entraînée par les vents (de 1 à 50 %) : on parle de dérive ou de volatilisation. Plus précisément, la volatilisation correspond au passage à l'état gazeux d'une substance. Les pertes par volatilisation sont très variables d'une molécule à une autre, il est donc difficile de les quantifier. Avant de retomber sur le sol lors des pluies, les produits phytosanitaires précédemment volatilisés peuvent être en partie décomposés dans l'air. Pour cela des réactions de photolyse, c'est-à-dire de clivage d'une ou de plusieurs liaisons d'une entité moléculaire sous l'action de rayons ultra-violet, ou des réactions d'oxydation peuvent avoir lieu.

### **4.2.1.2. Adsorption/désorption sur les composés organiques et minéraux du sol**

Une fois au sol, la dégradation des composés peut survenir par le biais de différents processus. Cependant, pour qu'un phytosanitaire soit dégradé, il faut qu'il soit disponible. Cette disponibilité peut varier en fonction de l'adsorption dans le sol qui consiste en l'enrichissement d'une ou plusieurs espèces chimiques (ici, les produits phytosanitaires) sur une interface (ici la plante et le sol) (Calvet, 1989). De multiples facteurs peuvent influencer l'adsorption, selon les propriétés des produits phytosanitaires, l'adsorbé, mais aussi du sol, l'adsorbant, et des facteurs externes (température, humidité du sol).

### **4.2.1.3. Dégradation physico-chimique et biologique**

La dégradation des composés peut survenir par le biais de différentes voies, biologiques ou physico-chimiques. Dans le sol vivent des micro-organismes. Par leur activité, ils peuvent biodégrader les molécules phytosanitaires, entraînant le plus souvent une disparition non totale de la molécule mère, et une production de nombreux métabolites dont la toxicité peut être supérieure à celle de la molécule mère. Ce type de dégradation est appelée dégradation biologique ou biodégradation. Toutes les molécules sont susceptibles d'être dégradées par les micro-organismes étant donné qu'elles peuvent servir de substances nutritives à ceux-ci. Cependant, les pesticides, molécules de synthèse, peuvent contenir des groupements qui, naturellement, ne sont pas présents dans l'environnement. Ces groupements tendent à rendre la molécule beaucoup plus résistante à la biodégradation et persistante dans le milieu.

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

La dégradation de molécules est mesurée par leur temps de demi-vie DT50, qui correspond au temps nécessaire pour que 50 % d'une substance disparaisse du sol ou de l'eau à la suite de diverses transformations. La dégradation est souvent lente juste après l'application du produit, puis son taux augmente avec l'accroissement de la population des micro-organismes dégradant le pesticide.

Outre la présence de microorganismes, dans les premiers millimètres du sol, les phytosanitaires peuvent être dégradés sous l'effet de la lumière. Ce processus est appelé photodégradation. La proportion de rayonnement ultraviolet de longueur d'onde comprise entre 10 et 400 nm influe sur le taux de dégradation.

### **4.2.1.4. Transport par l'eau par ruissellement et infiltration**

Parmi les vecteurs susceptibles d'entraîner les molécules, l'eau représente le vecteur majoritaire de migration (Czernichowski-Lauriol et Caudron, 1999). En effet, c'est par des processus de ruissellement sur les sols jusqu'aux eaux de surface des rivières et d'infiltration (ou lixiviation) dans les eaux profondes et donc dans les nappes que les molécules phytosanitaires peuvent se retrouver, in fine dans les milieux aquatiques.

### **4.2.1.5. Les pesticides dans le Bassin d'Arcachon**

Les différents réseaux d'analyse des molécules phytosanitaires ont permis de détecter la présence de 21 molécules ainsi que des métabolites de ces molécules dans les cours d'eau et le Bassin d'Arcachon. Les pesticides les plus présents dans les tributaires et l'intrabassin tels que le métolachlore, l'acétochlore ou encore le cuivre (en tant que fongicide et bactéricide) proviennent de l'agriculture, identifiée comme la source principale des pesticides dans le Bassin d'Arcachon. Une source domestique de pesticides est aussi évoquée (Budzinski et al., 2011), avec notamment l'imidaclopride (utilisé pour contrôler les insectes suceurs ou pour le traitement des animaux domestiques contre les puces) ou le glyphosate (herbicide non sélectif). Il a été rapporté que les pesticides sont employés dans des activités régulières comme l'agriculture, l'entretien des espaces verts, des routes et des voies ferrées ou encore dans des activités plus ponctuelles comme la démoustication ou la lutte contre les termites. Le Réseau REPAR, au cours de différents suivis, est arrivé au constat que la Leyre représente le vecteur majoritaire d'apport de pesticides vers le Bassin d'Arcachon. Plus de 90% des pesticides retrouvés dans les eaux du Bassin sont apportés par cette voie (Budzinski et al., 2011). En ce qui concerne les insecticides tels que l'imidaclopride, ceux-ci transitent par les ruisseaux après leur utilisation au niveau du bassin versant (maïsiculture) et de leur utilisation chez les particuliers. Ces produits et leurs métabolites pourraient s'accumuler dans le bassin, soit à cause des arrivées qui peuvent être fréquentes, soit à cause de la rémanence des molécules. En effet Auby et al. dans leur étude de 2007 sur l'état de la contamination du Bassin d'Arcachon ont constaté que les insecticides

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

apparaissent sporadiquement dans les ruisseaux, alors que dans les eaux du Bassin, certains de ces contaminants présentent des temps d'occurrence plus longs. Il faut ajouter à cela que le temps de renouvellement des eaux du bassin d'Arcachon est assez long (Plus et al., 2006) ce qui peut jouer sur la persistance de ces molécules dans le Bassin.

Les empreintes de contamination de la Leyre, du Canal des Etangs et des sites de l'intrabassin sont largement dominées par le métolachlore et ses principaux métabolites, le métolachlore OA et le métolachlore ESA. Cette présence du métolachlore et de ses métabolites dans les tributaires du Bassin est cohérente avec son usage en maïsiculture. Un classement a été mis en place par l'INERIS, le classement SIRIS-Pesticides, basé sur cinq critères (quantités utilisées ou appliquées, affinité pour le sol, solubilité dans l'eau, dégradabilité dans l'eau, dégradabilité dans le sol) conditionnant l'exposition possible aux pesticides des eaux de surface ou des eaux souterraines via le potentiel des molécules à atteindre ces eaux. Selon ce classement, le S-métolachlore est la molécule la plus susceptible d'être retrouvée dans les eaux du Bassin d'Arcachon (Figure 20).

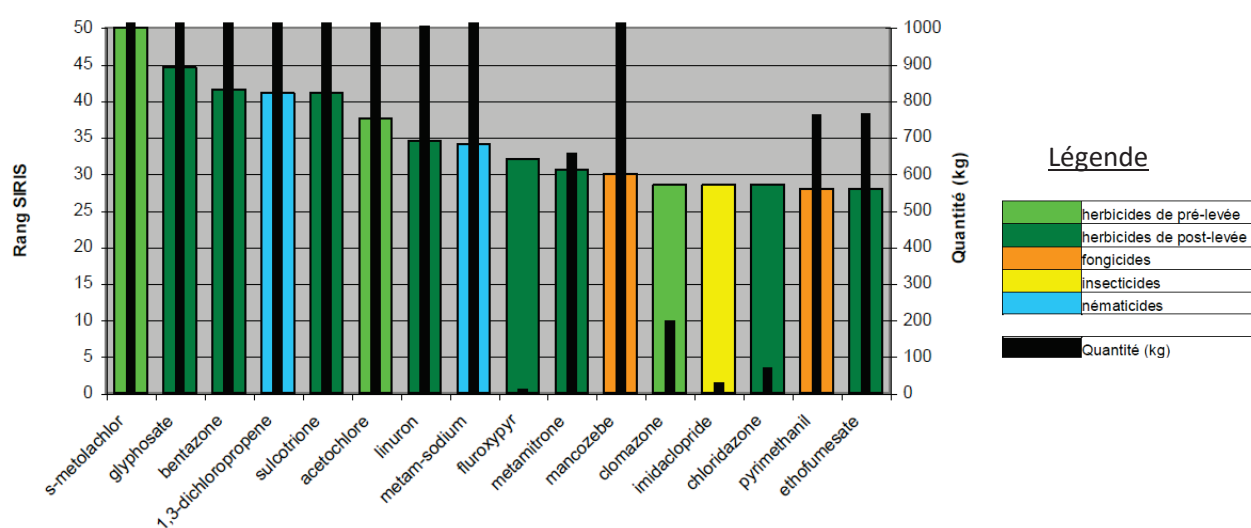


Figure 20 : Substances actives arrivées en tête de classement SIRIS et quantité utilisée sur une année, par famille chimique au Bassin d'Arcachon (Dagens, 2012)

### 4.2.2. Le métolachlore

Le métolachlore [2-Chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-(2-methoxy-1-methylethyl)-acetamide] est l'un des herbicides les plus utilisés de manière intensive dans l'agriculture (maïsiculture) dans le bassin versant du Bassin d'Arcachon (Budzinski et al., 2011). Il contrôle à travers des traitements pré et post levée, la germination des graminées ou mauvaises herbes en étant absorbé par l'hypocotyle des plantules. Il fait partie de la famille des chloroacétamides (Kegley et al., 2011), dont le mode d'action

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

consiste à inhiber plusieurs processus biologiques (biosynthèse essentiellement) agissant sur les zones méristématiques des plantes (Neves et al., 2015). C'est un inhibiteur des élongases, responsable de l'élongation des acides gras à longue chaîne en inhibant l'expression du gène FAE1 (Trenkamp et al., 2004). Il affecte également d'autres voies importantes responsables de la transformation du géranylgeranyl pyrophosphate en  $\beta$ -carotène et  $\alpha$ -carotène (Cunningham et al., 1996) conduisant à des plantes ayant des prédispositions à un stress oxydatif (Warner and Frankel, 1987).

Il est régulièrement détecté dans les eaux de surface et des eaux souterraines (Xu et al., 2010) de par sa très grande solubilité dans l'eau et son faible coefficient d'adsorption sur le sol  $K_{oc}$  (Tableau 9). Le métolachlore a été initialement introduit en tant que produit racémique contenant les deux énantiomères R et S dans un même rapport. Interdit en France depuis 2003, ce mélange est maintenant remplacé dans le monde entier par le (S) –métolachlore qui a les mêmes propriétés biologiques que le mélange racémique (O'Connell et al., 1998). Le S-métolachlore, substance active des pesticides, appartient à la famille des chloroacétamides.

Tableau 9 : Propriétés physiques et chimiques du métolachlore (adapté de Rivard, 2003)

Propriétés physiques et chimiques	
<b>Formule brute</b>	$C_{15}H_{22}ClNO_2$
<b>Masse molaire</b>	283.46 g.mol <sup>-1</sup>
<b>Solubilité dans l'eau</b>	530 mg.L <sup>-1</sup> (à 20°C)
<b>Coefficient d'adsorption dans le sol (<math>K_{oc}</math>)</b>	200 mL.g <sup>-1</sup>

La concentration du métolachlore dans les eaux du Bassin d'Arcachon a été signalée <10 ng.L<sup>-1</sup> (Ifremer, 2004). Mais les métabolites de cette molécule peuvent parfois atteindre des niveaux chroniques de 100 ng.L<sup>-1</sup> (Budzinski et al., 2011). La concentration du S-métolachlore dans la lagune varie en fonction des sites d'échantillonnage et des saisons (Budzinski et al., 2011). La PNEC du métolachlore a été estimée à 6,7  $\mu$ g.L<sup>-1</sup> de métolachlore (Dagens, 2012).

Dans la Baie de Chesapeake dans le Maryland, sur l'année 1997, des concentrations de 0,4 à 58 ng.L<sup>-1</sup> ont été mesurées (Lehotay et al., 1998) tandis que dans le Bassin du Mississippi dans le Golfe du Mexique des concentrations de 50 ng.L<sup>-1</sup> ont été mesurées entre 1991 et 1997 (Clark et al., 1999). Entre 5,7 et 7,2 ng.L<sup>-1</sup> de métolachlore ont été enregistrés dans les eaux de la baie de Biscayne aux Etats-Unis entre 1999 et 2000 (Carriger and Rand, 2008).

Le métolachlore est un composé pouvant avoir des effets néfastes sur les organismes aquatiques à de faibles concentrations pouvant atteindre le ng.L<sup>-1</sup>. En effet, après 24 h d'exposition, une augmentation

significative des dommages à l'ADN et du pourcentage de malformations des larves D de l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* ont été observés à partir de 10 ng.L<sup>-1</sup> de S-métolachlore. Les spermatozoïdes de l'espèce se sont avérés également très sensibles au métolachlore (Mai et al., 2013, 2012). Chez la daphnie *Daphnia magna*, une LOEC et une NOEC respectivement de 0,5 et 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de S-métolachlore (Liu et al., 2006) ont été déterminées. Une réduction significative de la fécondité, un retard de développement (augmentation de l'âge à la première reproduction), ont été observés chez la daphnie *Daphnia longispina* avec une EC<sub>50</sub> de 18,71 mg.L<sup>-1</sup>. Le métolachlore est modérément toxique chez les poissons comme la truite arc-en-ciel, la carpe, le barbeau de rivière et le crapet arlequin. Les valeurs de CL<sub>50</sub> 96 heures déclarées pour ce composé sont d'environ 3 mg.L<sup>-1</sup> pour la truite arc-en-ciel, 5 mg .L<sup>-1</sup> chez la carpe et la barbeau de rivière, et de 15 mg .L<sup>-1</sup> chez le crapet arlequin (Rivard, 2003).

## 5. Les biomarqueurs

En écotoxicologie, le terme biomarqueur se réfère « à tous les paramètres biochimiques, cellulaires ou physiologiques ou comportementaux qui peuvent être mesurés dans les tissus ou les fluides d'un organisme ou sur l'organisme entier pour mettre en évidence l'exposition à, ou les effets, d'un ou plusieurs contaminants » (Depledge, 1994). Plusieurs types de marqueurs biologiques ont été recensés : les biomarqueurs d'exposition, les biomarqueurs d'effet et les biomarqueurs de susceptibilité (Amiard et al., 2006). Pour les expérimentations estivales, des biomarqueurs généralistes tels que le pourcentage d'occupation gonadique ont permis d'observer ce qui se passe dans le milieu naturel. La bioaccumulation des pesticides à l'échelle de l'organisme a également été évaluée. Enfin des biomarqueurs plus spécifiques, à l'échelle cellulaire, ont été employés, à savoir l'étude de l'expression génique de 22 gènes, mais aussi l'étude des mécanismes épigénétiques.

### 5.1. Biomarqueur généraliste : examen histologique des gonades

A partir du début du XIX<sup>ème</sup> siècle, le microscope optique est perfectionné et l'optique bénéficie de grandes améliorations permettant d'obtenir des images beaucoup plus proches de la réalité. C'est à partir de cette période que les techniques histologiques se sont développées. Cette discipline s'est rapidement intéressée à la morphologie des cellules (l'histochimie), mais aussi à leur fonctionnement et à la conception des tissus (histophysiologie). On distingue quatre familles de tissus, qui sont étudiés dans le cadre de l'histologie générale :

- les épithéliums
- les tissus conjonctifs
- les tissus musculaires
- les tissus nerveux.

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

L'histologie plus spécialisée s'intéresse à l'étude de la structure des organes en étudiant l'anatomie microscopique d'une part et l'histophysiologie d'autre part. Pour identifier et déterminer l'état de maturation des gonades, une étude histologique a été réalisée sur les géniteurs prélevés aux différentes dates et sites d'étude.

### 5.2. Biomarqueur à l'échelle cellulaire

#### 5.2.1. L'expression génique

Le niveau d'expression des gènes est modulé par les cellules en fonction, notamment, de la pression environnementale exercée sur l'organisme (contamination, stress oxydant...). L'expression génique traduit donc l'activation d'un gène, l'information génétique qu'il contient étant lue puis traduite afin de synthétiser des protéines aux fonctions diverses. Ainsi, quand un gène est exprimé, de l'ARN est synthétisé. Par conséquent, plus un gène est exprimé, plus la quantité d'ARN synthétisé sera importante proportionnellement à son niveau d'activation. Ainsi des modifications d'expression génique se traduisent par des variations dans les quantités d'ARN codant notamment pour des protéines impliquées dans la réponse au stress. La qRT-PCR (Retrotranscription polymerase chain reaction) a pour objectif d'analyser ces profils d'expression génique.

Le génome entier de *C. gigas* a été séquencé en 2012 par Zhang et collaborateurs (Zhang et al., 2012). 22 gènes ont ainsi été sélectionnés dans cette étude (Tableau 9) dont les fonctions métaboliques associées à leur expression sont diverses.

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

Tableau 10 : Gènes étudiés et couples d'amorces utilisées lors de l'analyse génétique

Gène	Séquence 5'-3'	Fonction
<i>β-actin</i>	AGTACCCATTGAACACGG <sup>a</sup> TGGCGGGAGCGTTGAA <sup>b</sup>	Cytosquelette-Gène de référence
<i>ef1</i> <sup>2</sup>	AGAATGGATATGCGCCTGT <sup>a</sup> GCCACGGTCTGCCTCA <sup>b</sup>	Facteur d'élongation – Gène de référence
<i>rpl7</i>	ACACCTCGGACGCTTT <sup>a</sup> GCTGTCTTACGCAGGC <sup>b</sup>	Protéine ribosomale – Gène de référence
<i>12S</i>	CTCAGTCTTGC GGAGG <sup>a</sup> GGTTATGCGGAACCGCC <sup>b</sup>	Métabolisme mitochondrial
<i>cox1</i>	GTGCCAACTGGTATTAAGGTGT <sup>a</sup> ACACCGCACCCATTGAT <sup>b</sup>	Métabolisme mitochondrial
<i>sodMn</i>	ACAAAGTCAATCAGTGCCCT <sup>a</sup> CCATTGCCTCTGCCAGT <sup>b</sup>	Défense stress oxydant
<i>sod Cu/Zn</i>	CCAGAGGATCACGAGAGGC <sup>a</sup> GCGTTTCCGGTCGTCTT <sup>b</sup>	Défense stress oxydant
<i>cat</i>	GTCGTGCCCTTTACAACC <sup>a</sup> CGCCCGTCCGAAGTTT <sup>b</sup>	Défense stress oxydant
<i>gpx</i>	ATCGAACGCTGCACCA <sup>a</sup> AGCTCCGTGCGATTGT <sup>b</sup>	Défense stress oxydant
<i>mt1</i>	TGTCTGCTCTGATTCGTGTCCAGC <sup>a</sup> GGTCCTTTGTTACACGCACTCATTT <sup>b</sup>	Détoxication
<i>mt2</i>	TCCGGATGTGGCTGCAAAGTCAAG <sup>a</sup> GGTCCTTTGTTACACGCACTCATTT <sup>b</sup>	Détoxication
<i>hsp70</i>	CGACAATAGAATGGTCAATCACTTT <sup>a</sup> GCTCGTGTGATTTTGCTGTAG <sup>b</sup>	Réponse aux chocs thermiques
<i>hsp90</i>	GGTATCTAACCGTCTGGTGACA <sup>a</sup> TGTCTGCCTCAGCCTTATCC <sup>b</sup>	Réponse aux chocs thermiques
<i>p53</i>	CCCTCAAAGCAGTCCCCA <sup>a</sup> TGTAGCGATCCACCTGATT <sup>b</sup>	Régulation du cycle cellulaire/apoptose
<i>cyp1A</i>	AGGCATAGGGCTACA <sup>a</sup> CTGGTTTCGCGGGTTTCAT <sup>b</sup>	Biotransformation
<i>bax</i>	CCCTCAGGTGTGACCCG <sup>a</sup> TGCAACGTAAAGCTCTGCC <sup>b</sup>	Apoptose
<i>casp3</i>	ATGATGCGACTCAATCACCC <sup>a</sup> ACTGGCTTATGTGCTTGTGTTCC <sup>b</sup>	Apoptose
<i>casp6</i>	CTCCCCTTACAGAGGAACA <sup>a</sup> ACTTCGCTAGATCGTCTCTATCAA <sup>b</sup>	Apoptose
<i>casp9</i>	CGCTCCATACTGAGGCGG <sup>a</sup> GCTTTCTGGCCTCGCT <sup>b</sup>	Apoptose
<i>acoA</i>	GGGCACCGTTAATGCCTAC <sup>a</sup> TGA CTGGGGTCATGTGTT <sup>b</sup>	Métabolisme des lipides
<i>Tgl</i>	ACACCCACCGTGCTTT <sup>a</sup> GTTTGTCTTGAGATCCTTGATTATCAG <sup>b</sup>	Métabolisme des lipides

a : amorce sens b: amorce anti-sens

### 5.2.1.1. Gènes de référence

Les gènes de référence, également appelés gènes de ménage, sont des gènes dont l'expression reste constante pour un tissu et un stade de développement donnés et dans les conditions expérimentales testées (Vandesompele et al., 2002). Ils servent de contrôle interne. Dans ce cadre, le gène de la  $\beta$  actine (*act*) qui est impliqué dans la constitution du cytosquelette cellulaire a été choisi comme gène de référence (Mori et al., 2008). Deux gènes de référence supplémentaires ont été sélectionnés : EF1- $\alpha$  (Elongation factor 1  $\alpha$ ) et RpL7 (Ribosomal protein Large subunit number 7). La traduction suit un ordre précis d'événements : initiation, élongation et terminaison. Au cours de la deuxième étape, des facteurs d'élongation sont nécessaires. Parmi ceux-ci, EF1- $\alpha$ , est responsable de la sélection et de la liaison de l'aminocyl-ARNt apparenté au site A (site accepteur) du ribosome (Figure 21). De plus, une étude récente sur les larves d'huitres de *Crassostrea gigas* a montré que RpL7 peut être utilisé comme contrôle interne pour étudier l'expression des gènes chez des larves normales ou infectées (herpes virus) (Du et al., 2013).

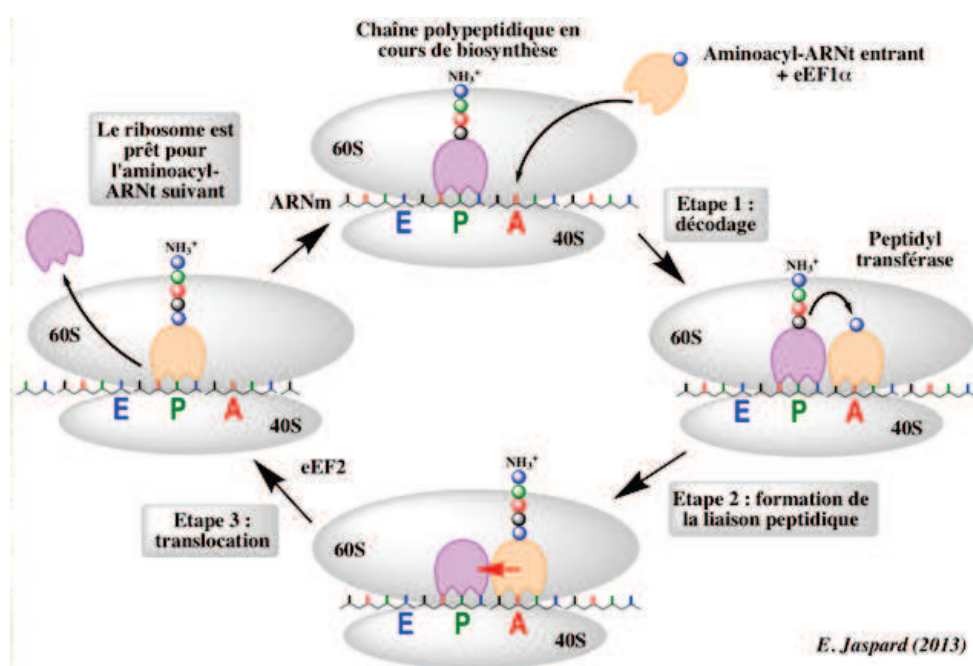


Figure 21 : Schéma représentatif des différentes étapes de la traduction (Jaspard 2013)

### 5.2.1.2. Réponse au stress oxydant

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités anti-oxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire (Barouki, 2006). Lorsque des espèces réactives à l'oxygène commencent à s'accumuler dans la cellule, ils peuvent être neutralisés par des molécules de défense anti-oxydantes présentes dans la cellule. Parmi celle-ci, quatre gènes interviennent dans la réponse contre le stress oxydant ; la superoxyde dismutase cytoplasmique (Cu/Zn), la superoxyde dismutase mitochondriale (*sodMn*), la catalase (*cat*) et la



glutathion peroxydase (*gpx1*) (Figure 22). En effet, des espèces réactives à l'oxygène peuvent être produites par certains stimuli externes comme les changements de température de l'eau (Chen et al., 2007) et entraîner une surexpression de gènes liés à ce stress, comme la *sodMn* (Park et al., 2009).

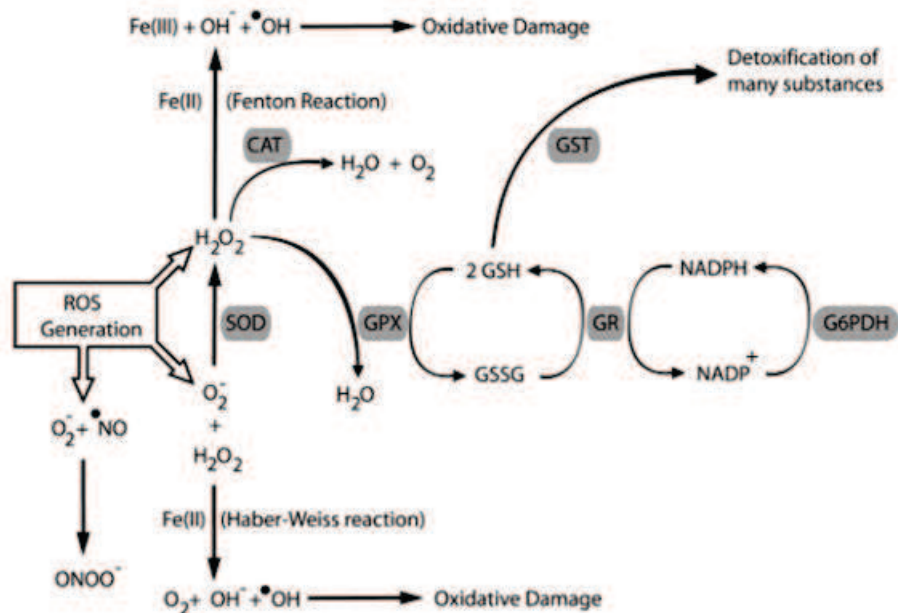


Figure 22 : Réponse au stress oxydant. Les abréviations SOD, CAT, GST, GR, et G6PDH représentent les enzymes superoxyde dismutase, catalase, glutathion S-transferase, glutathion réductase ; glutathion peroxydase et glucose-6-phosphate déshydrogénase respectivement (Hermes-Lima, 2004)

En 2014, Mai et ses collègues ont montré une action du métolachlore sur l'expression de ces différents gènes, avec notamment une forte induction de la superoxyde dismutase mitochondrial dès de faibles concentrations (1ng/L et 10 ng/L) et une répression à plus forte concentration. La catalase est, elle, réprimée à toutes les concentrations.

### 5.2.1.3. Métabolisme mitochondriale

Tout organisme vivant fonctionne grâce à un ensemble de réactions chimiques, par lequel il extrait de l'énergie de son environnement pour synthétiser ses propres constituants. La synthèse d'ATP est ainsi réalisée par phosphorylation oxydative, processus orchestré par la chaîne respiratoire mitochondriale. La mitochondrie est limitée par deux membranes externe et interne. Dans cette dernière est localisée la chaîne de transport d'électrons (chaîne respiratoire). Elle représente un ensemble de cinq complexes protéiques assurant un transfert de protons et/ou d'électrons : la NADH déshydrogénase (Complexe I), la succinate déshydrogénase (Complexe II), le complexe bc 1 (Complexe III), la cytochrome-c-oxydase (Complexe IV) et l'ATP synthase (Complexe V) (Figure 23). La cytochrome-c-oxydase est l'enzyme ayant pour rôle de réduire l'oxygène moléculaire en  $H_2O$  via l'oxydation du cytochrome c (Verkhovsky et al., 2006). Le cuivre est le constituant principal de son cœur catalytique, formé lui-même de 3 sous-unités (Wikström, 2010). Le gène de la sous-unité 1 de la cytochrome-c-

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

oxydase (*cox1*) a été sélectionné dans notre étude puisque c'est celle-ci qui contient le site catalytique de l'enzyme, c'est pourquoi il s'agit de la sous-unité la plus importante du complexe. Le gène de l'ARN ribosomique 12S, représentatif du métabolisme mitochondrial a également été sélectionné. En effet, le génome mitochondrial des eucaryotes code pour deux ARN ribosomiques 12S et 16S. Il a été montré que l'expression du gène 12S est réprimé après exposition des larves D de l'huître creuse *Crassostrea gigas* à des concentrations en métolachlore de  $100 \text{ ng.L}^{-1}$  (Mai et al., 2014).

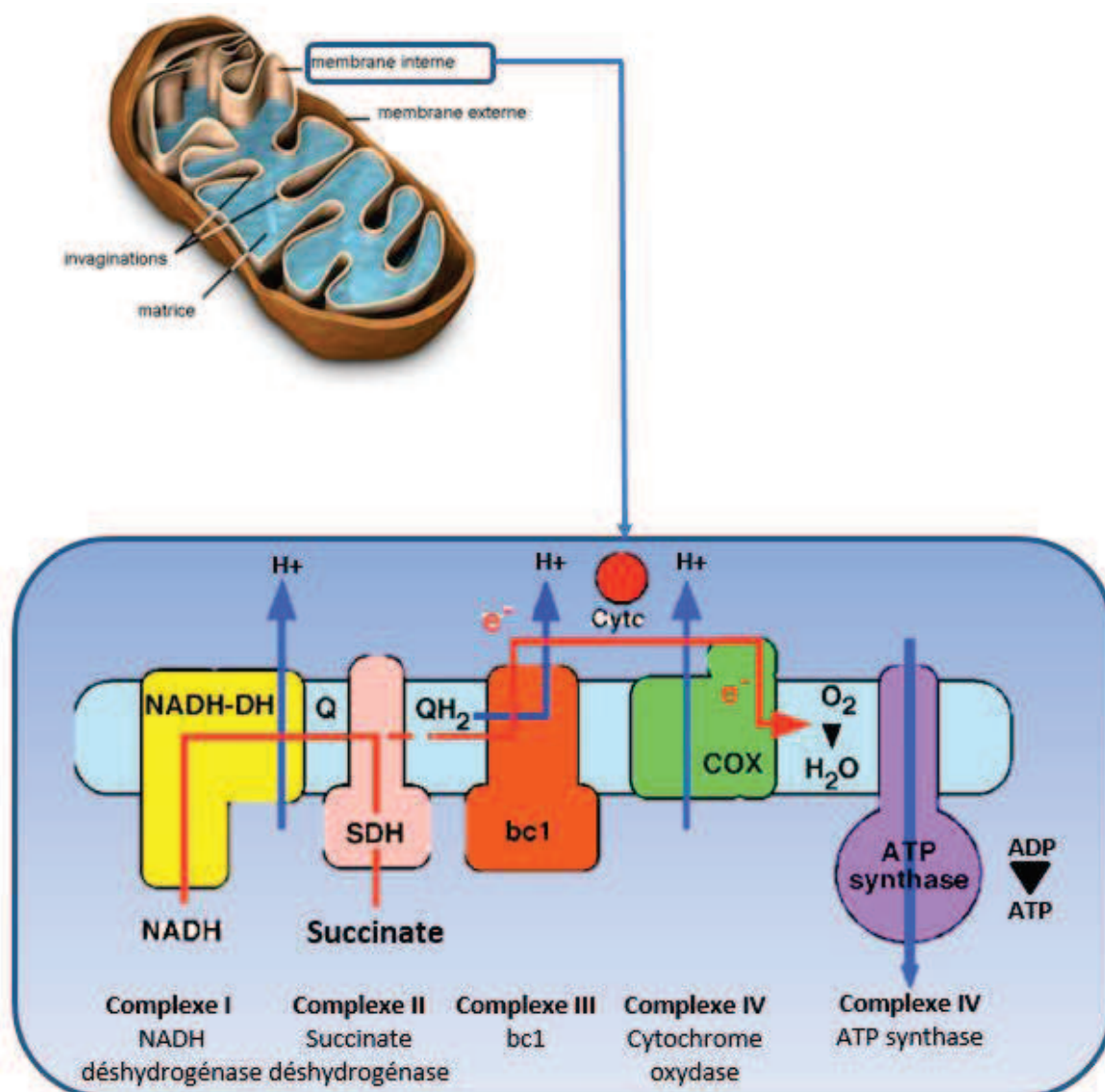


Figure 23 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale (adapté de Saraste, 1999)

#### 5.2.1.4. Processus de détoxification

La détoxification est un processus par lequel un organisme va lutter contre des xénobiotiques, ceci par réduction des propriétés toxiques de la substance, puis en augmentant sa polarité et donc son hydrosolubilité afin d'en faciliter son élimination. C'est pour cela que deux gènes intervenant dans la détoxification ont été sélectionnés, les isoformes 1 et 2 des métallothionéines impliquées dans la séquestration des métaux (Amiard et al., 2006; Roesijadi, 1992) et dans la lutte contre le stress oxydant (Ruttkey-Nedecky et al., 2013) : *mt1* et *mt2*. Les métallothionéines peuvent être induites par les métaux dans plusieurs taxa incluant les mammifères, les poissons et les invertébrés aquatiques (Amiard et al., 2006; Bebianno and Serafim, 1998). Leur niveau d'expression varie donc en fonction de la contamination du milieu chez les organismes adultes. Cependant, les métallothionéines dans les embryons sont transmises par la mère (Mao et al., 2012a). Ceci laisse à penser que le niveau d'expression dans la descendance varie en fonction de ce qui a été transmis par la mère, mais aussi en fonction de l'environnement dans laquelle se développe cette descendance.

#### 5.2.1.5. Réponse au changement de température

Les cellules d'un organisme peuvent être soumises à des agressions diverses ce qui impose une faculté d'adaptation indispensable à leur survie. Les organismes ont ainsi développé la capacité de résister à une augmentation de température de quelques degrés au-dessus du niveau physiologique en induisant la synthèse d'un ensemble de protéines appelées protéines de choc thermique ou HSPs (Heat Shock Proteins). C'est pourquoi des gènes impliqués dans la réponse à l'augmentation de température : *hsp70* et *hsp90* ont aussi été sélectionnés. La famille la plus étudiée est la famille des protéines de 70 kDa de par leur rôle de chaperonnes et leur implication dans le processus de thermo-tolérance acquise (Lindquist and Craig, 1988). Chez les huîtres, les *hsp 70* peuvent être induites par un stress thermique (*Ostrea edulis* : Piano et al., 2002 ; *Crassostrea gigas* : Hamdoun et al., 2003). Les *hsp 90* répondent elles aussi au choc thermique d'après l'étude menée par Farcy et al. en 2009 sur *Crassostrea gigas* au stade adulte (Farcy et al., 2009).

#### 5.2.1.6. Métabolisation des xénobiotiques

En réponse à l'exposition à des xénobiotiques, des enzymes variées peuvent être produites comme le cytochrome P4501A (Boutet et al., 2004a). Ce dernier intervient dans la phase 1 de processus de biotransformation du xénobiotique, c'est-à-dire l'oxydation des xénobiotiques. C'est pourquoi le gène *cyp35a1* codant pour le cytochrome P450 35A1 sera étudié.

#### 5.2.1.7. Dommage à l'ADN

La protéine p53 joue plusieurs rôles fondamentaux comme l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S, la réparation de l'ADN ou la mort cellulaire par apoptose. En l'absence de stress, p53 est

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

présente dans un état inactif et n'est pas phosphorylée. En revanche, lorsqu'une cellule subit un stress, une accumulation de p53 est observée dans le noyau. Cette accumulation est liée à une stabilisation de la protéine par phosphorylation. Un des rôles de p53 est d'activer, entre autres, l'expression du gène de *bax*. La protéine BAX, en se dimérisant, va perforer la membrane mitochondriale pour permettre au cytochrome c d'en sortir. La sortie de ce dernier de la mitochondrie vers le cytosol est un événement central dans le processus apoptotique intrinsèque. Il a donc été décidé d'étudier le gène codant pour la protéine BAX.

### 5.2.1.8. Apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est causée par des stimuli déclenchant l'activation d'une cascade de protéines « suicides » (Campbell et Reece, 2004). Une famille de protéines occupe une place centrale dans le mécanisme moléculaire de l'apoptose : les caspases. Les caspases sont des enzymes de contrôle de la vie et de la mort cellulaire. Parmi les caspases à activité pro-apoptotique, on distingue : les caspases initiatrices (2, 8, 9, 10) à prodomaine long qui sont actives sous forme monomérique ; les caspases effectrices (3, 6 et 7) à petit prodomaine qui s'assemblent en hétérodimère actif. 3 caspases ont alors été sélectionnées, parmi les plus étudiées : les caspases 3, 6 et 9 (Mermet-Bouvier, 2006; Shi, 2002).

### 5.2.1.9. Métabolisme des lipides

Les recherches menées par Ben Kheder en 2007 ont permis de montrer que suite à une privation nutritionnelle, les lipides neutres sont totalement consommés au 6ème jour, démontrant ainsi que les réserves endogènes chez *C. gigas* sont entièrement utilisées au cours de la première semaine de vie, pour une température d'élevage de 25 °C (Ben Kheder, 2007). Cette consommation de lipide se fait via la lipolyse qui correspond à une dégradation des lipides par hydrolyse des triglycérides. La lipolyse est un ensemble de voies métaboliques énergétiques permettant la production d'ATP, grâce à l'oxydation des graisses. Elle comprend plusieurs voies métaboliques successives : la  $\beta$ -oxydation, le cycle de KREBS et la chaîne respiratoire mitochondriale. Il a donc été décidé d'étudier l'expression du gène de l'acétyl-CoA carboxylase (*acoA*), qui est l'enzyme limitante (car en dernière position) lors de la lipogénèse, ainsi que la lipase pancréatique triacylglycérol (*Tgl*) qui permet la lipolyse.

## 5.2.2. L'épigénétique

Bien que toutes les cellules présentes au sein d'un même individu soient composées d'une séquence identique d'ADN, la génétique apparait comme trop restreinte pour pouvoir expliquer la diversité possible au sein d'une même espèce, d'un même organisme, au cours de sa vie ou même à un temps donné. La notion d'hérédité des caractères acquis a été reléguée à l'arrière-plan, faute de preuves

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

suffisantes. De nos jours, peu de biologistes remettent en question la notion de variation héréditaire. En effet, les mécanismes moléculaires concernant le génome ainsi que l'expression des gènes peuvent être influencés par l'environnement et l'histoire individuelle. Ces mécanismes peuvent être potentiellement transmissibles d'une génération à l'autre. L'épigénétique correspond à l'ensemble de ces modifications. Cette notion est attribuée à Waddington, généticien et biologiste du développement. Il essayait de comprendre comment certaines modifications des paramètres environnementaux (températures) ou externes (drogues) pouvaient influencer le développement d'un organisme (Waddington, 1942). Alors que la génétique correspond à l'étude des gènes, l'épigénétique s'intéresse à une "couche" d'informations complémentaires qui définit comment ces gènes vont être utilisés par une cellule... ou ne pas l'être. En d'autres termes, l'épigénétique correspond à l'étude des changements dans l'activité des gènes, n'impliquant pas de modification de la séquence d'ADN et pouvant être transmis lors des divisions cellulaires (Inserm, 2015). Contrairement aux mutations qui affectent la séquence d'ADN, les modifications épigénétiques sont réversibles. Ainsi, l'épigénétique gouverne la façon dont le génotype est utilisé pour créer un phénotype. Beaucoup d'organismes répondent aux conditions de leur environnement en affichant une certaine plasticité phénotypique, résultant en la production de différents phénotypes pourtant issus du même génome d'ADN (Kucharski et al., 2008). Dans cette étude, les auteurs ont démontré qu'une même larve d'abeille pouvait devenir une reine ou une ouvrière en fonction de la façon dont elle est nourrie.

L'épigénétique représente donc l'ensemble des mécanismes permettant à une cellule de faire face aux différents événements qu'elle rencontre au cours de sa vie, en modulant pour cela son programme d'expression génétique (Bird, 2007). L'épigénétique fait référence aux changements héréditaires de l'activité et de l'expression de gènes de la descendance d'une cellule ou d'un individu et aux changements sur le long terme du programme transcriptionnel d'une cellule.

Pour comprendre ce qui se passe au sein des cellules, il faut définir la notion d'épigénome. A la différence du génome qui représente l'ensemble du matériel génétique, à savoir les gènes transcrits d'une cellule, l'épigénome correspond à l'ensemble des marques apposées sur le génome et qui ne modifient pas la séquence de l'ADN. Ce sont des modifications qui interviennent dans la régulation des gènes. Il existe plusieurs grandes classes de modifications épigénétiques (Figure 24) :

- l'acétylation, la méthylation ou la phosphorylation des histones
- le remodelage du nucléosome
- la méthylation de l'ADN
- les ARN non-codants.

## Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

Nous pouvons donc nous demander si les larves D ont subi des modifications déjà présentes chez les géniteurs.

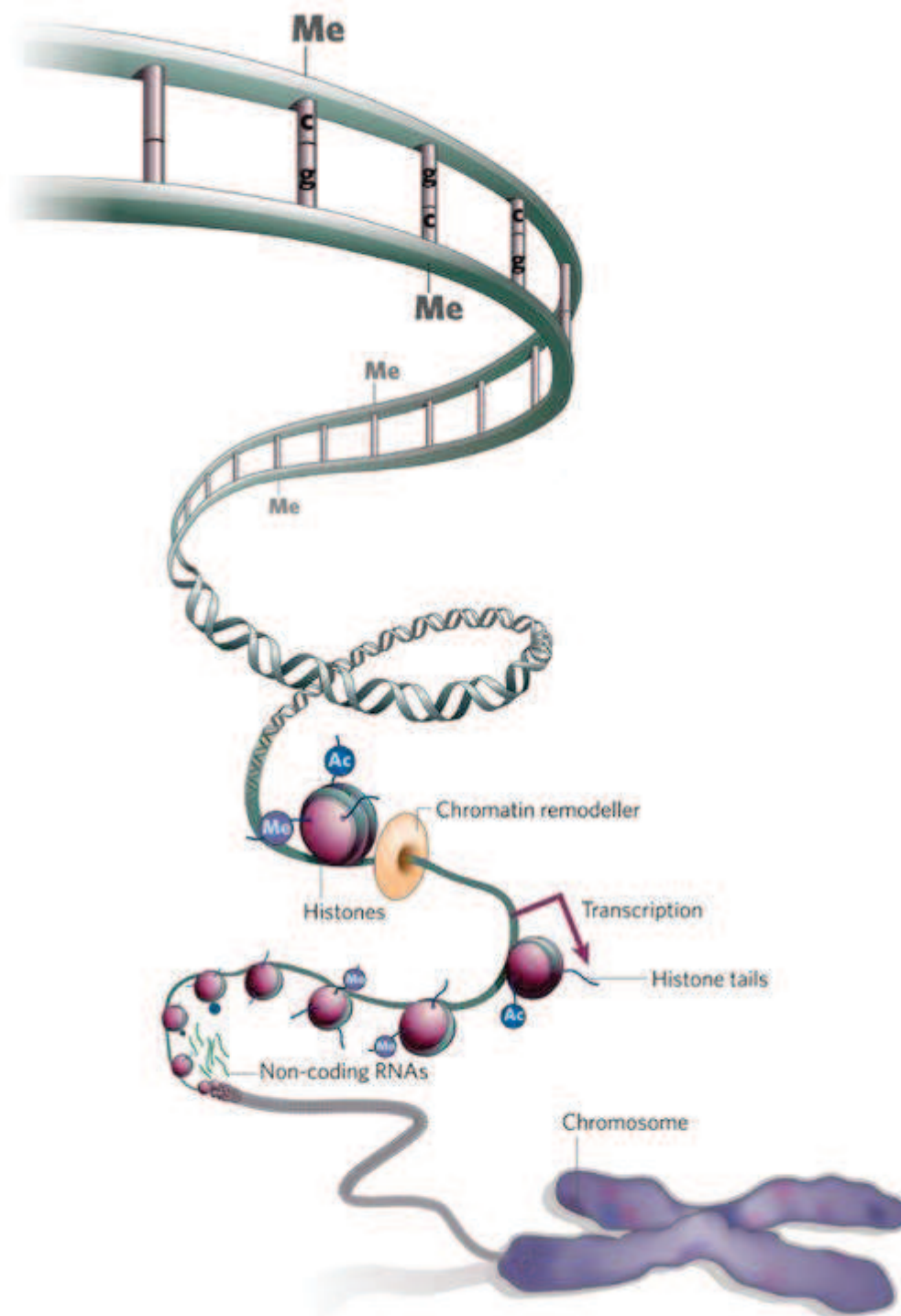


Figure 24 : Les modifications épigénétiques représentées à travers les différents niveaux de condensation de la chromatine (issue de Nature 454, 711-715 (7 August 2008))



---

## Chapitre 2 - BASES MÉTHODOLOGIQUES

---



## *Chapitre 2. Bases méthodologiques*

L'enjeu de ce travail de thèse a été de proposer des réponses quant à l'impact des polluants (le cuivre et le métolachlore) et du changement climatique (température, salinité) sur les capacités de reproduction de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arcachon. Pour cela, des huîtres en provenance de l'écloserie de Guernesey, mais aussi des huîtres sauvages et cultivées provenant directement du Bassin d'Arcachon ont été utilisées. Une comparaison de réponses biologiques entre ces deux types d'huîtres a été étudiée. Pour cela le dénombrement du pourcentage de malformations larvaires observées 24h après la fécondation a été réalisé. Cette étude a été enrichie de plusieurs analyses sur les huîtres du milieu afin de déterminer si des différences existent entre les huîtres sauvages et les huîtres cultivées, toutes deux productrices de larves dans le Bassin. Des analyses histologiques des gonades ont été menées, ainsi que des analyses moléculaires, afin d'étudier certains mécanismes d'action des polluants et des facteurs environnementaux. Dans ce chapitre, sont ainsi présentés le modèle biologique, les sites d'étude, et les différentes méthodologies et techniques d'analyses mises en œuvre.

## 1. Huîtres d'écloseries vs huîtres natives du Bassin d'Arcachon

La période de reproduction de *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arcachon s'étendant de juin à septembre (His, 1976), des huîtres matures en provenance du milieu naturel ne peuvent être obtenues au mieux que pendant ces 4 mois de période estivale. Au cours des autres mois de l'année, les géniteurs utilisés pour l'obtention des gamètes proviennent d'écloserie (Guernesey), fournissant des huîtres prêtes à pondre dès leur arrivée au laboratoire.

### 1.1. Huîtres de l'écloserie de Guernesey



Figure 25 : Vue aérienne de l'écloserie de Guernesey

L'écloserie de Guernesey est une entreprise familiale de production de semences d'huîtres et de palourdes. Située au niveau d'une carrière de granit de 2,5 hectares, l'eau de mer est échangée à l'aide d'une écluse au moment des marées de printemps (Figure 25). Cette écloserie est en mesure de produire jusqu'à 10 tonnes de naissains par an.

Les huîtres adultes mûres, appelées géniteurs, sont transférées à l'intérieur de l'écloserie et élevées dans une eau chauffée (Figure 26, A). Elles sont également nourries à l'aide de culture de micro algues (Figure 26, B). Une seule huître peut produire 20 à 30 millions d'œufs, mais, comme cette progéniture finit par grandir, le nombre est considérablement réduit, par un fréquent screening, en ne sélectionnant seulement que les plus rapides et les plus robustes naissains. Les petites huîtres au stade larvaire commencent leur vie en étant soigneusement entretenues dans de l'eau de mer chauffée et nourries à l'aide d'algues spécialement cultivées (Figure 26, C et D). Une fois les petits naissains de 2mm obtenus, ces derniers sont transférés en extérieur jusqu'à devenir adulte (Figure 26, E et F).

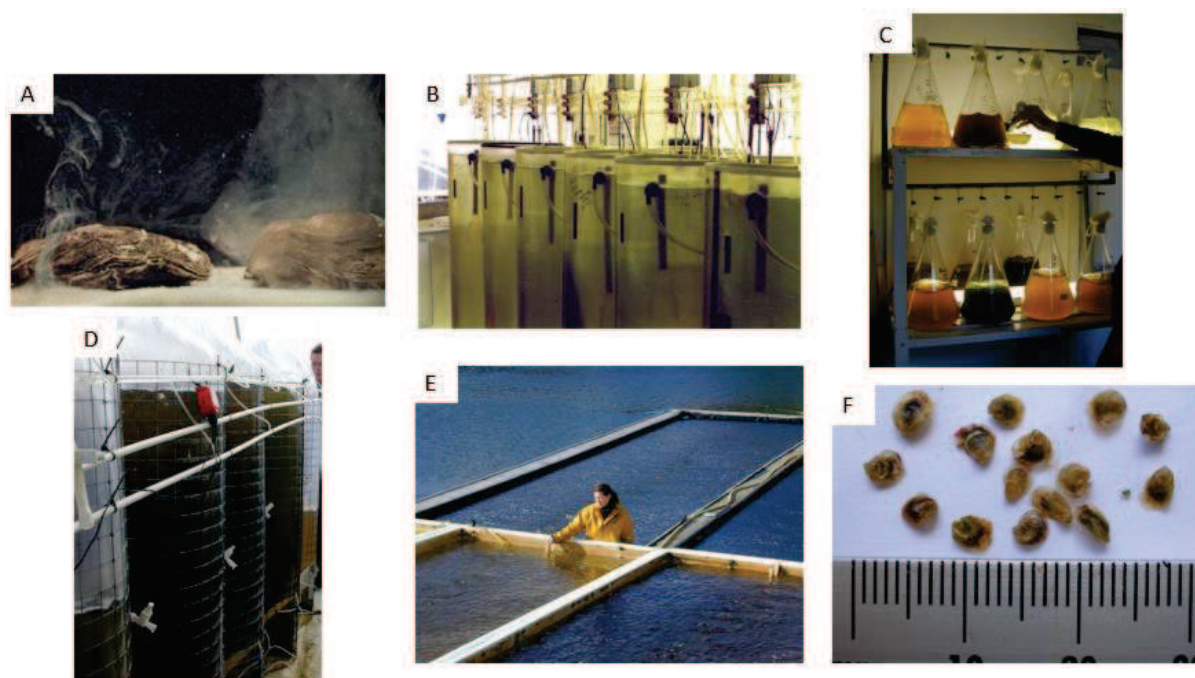


Figure 26 : Différentes étapes d'obtention des naissains puis des huîtres adultes. A- Les huîtres adultes sont maintenues à maturation dans une eau chaude puis mise à frayer. L'émission des semences peut être observée. B- Culture des micro-algues servant à la nutrition. C, D- Début de la culture des micro algues en petit béciers puis en grande structure externalisée. E, F- Les naissains obtenus sont transférés en bassin extérieur (issu du site [http://www.guernseyseafarms.com/Oyster\\_Seed/Hatcheryprocess.html](http://www.guernseyseafarms.com/Oyster_Seed/Hatcheryprocess.html))



Les huîtres déjà sexées sont réceptionnées dans un conditionnement bien particulier (Figure 27), chaque géniteur étant maintenu fermé à l'aide d'un élastique. Une bouteille d'eau réfrigérée permet de les maintenir à basse température, pour une conservation optimale et éviter les différences de température, qui pourraient entraîner des chocs thermiques, et par la suite le frai.

Figure 27 : Conditionnement des huîtres de Guernesey. Les individus sont maintenus fermés à l'aide d'un élastique en caoutchouc. Un pain de glace permet le maintien d'une température fraîche pendant le transport par avion

## 1.2. Huîtres natives du Bassin d’Arcachon

### 1.2.1. Populations sauvages vs huîtres cultivées

Les huîtres sauvages sont présentes dans leur milieu de génération en génération, s’accumulant sous forme de récifs et subissant les changements permanents du milieu dans lequel elles vivent. Les huîtres cultivées au contraire, sont entretenues dans des parcs, l’étape de pré-grossissement étant le plus souvent réalisée dans un autre environnement plus riche en nutriment avant d’être re-transférées dans leur milieu d’origine pour l’étape de grossissement. Au contraire des huîtres sauvages vivant à l’interface eau-sédiment, les huîtres cultivées sont pour leur part, surélevées sur des tables ostréicoles. Les objectifs de cette étude sont donc de déterminer la réponse des huîtres appartenant aux deux populations, naturelles ou cultivées, face aux variations des conditions de leur environnement. La réponse génétique des larves issues des deux populations sera également étudiée, afin de déterminer si des différences d’expression de gènes cibles existent.

### 1.2.2. Stratégie d’échantillonnage

Pour les deux campagnes menées en 2013 et en 2014, des huîtres de 18 mois ont été utilisées.

Pour la première année d’étude, deux ostréiculteurs ont été contactés au cours de l’hiver 2012 afin d’engager un travail en collaboration. L’objectif était de pouvoir prélever sur leur site des huîtres cultivées ayant passé au moins une année complète dans les eaux du Bassin. Nous nous sommes assurés au préalable de trouver des sites d’huîtres cultivées proche de récifs d’huîtres sauvages, afin de conserver les mêmes caractéristiques de masses d’eau. Ainsi, deux sites contrastés du Bassin ont été sélectionnés pour l’année 1 (été 2013) : Le Tès et Grand Banc.

Le Tès se situe face au port d’Arcachon, ce site est sous l’influence des eaux néritiques moyennes et est drainé par le chenal du Teychan. Grand Banc est situé à proximité de l’ouverture du bassin sur l’océan et est donc sous influence océanique. Il est sous influence des eaux néritiques externes bien que drainé également par le chenal du Teychan. Ce site est caractérisé par la présence de très nombreux parcs à huîtres en lien avec un captage important (Figure 28).

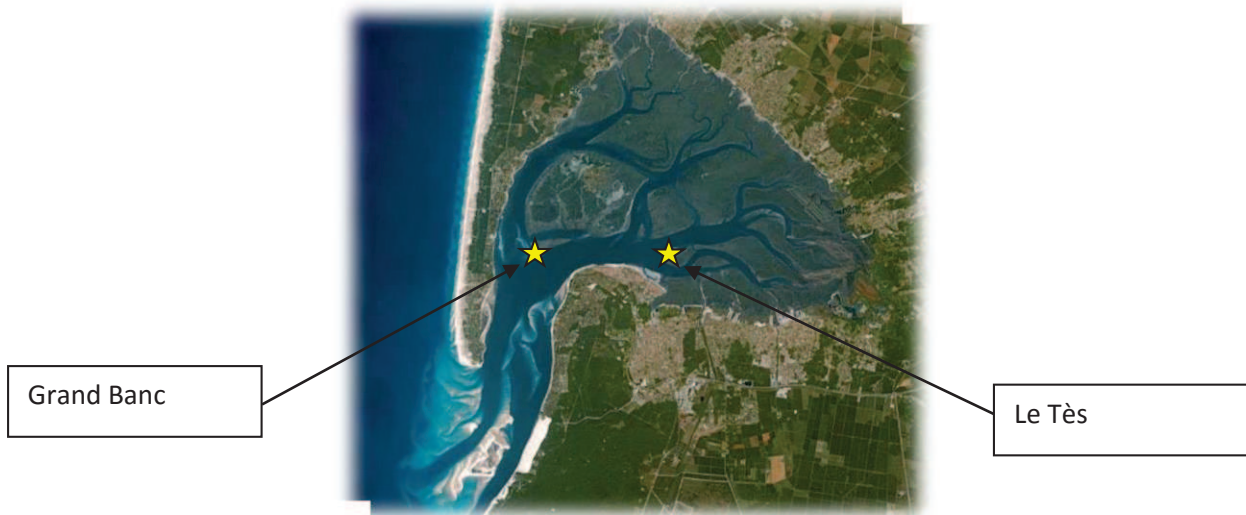


Figure 28 : Carte du bassin d’Arcachon représentant les deux sites d’étude pour la période estivale 2013

Les résultats acquis par Féliba (réseau ayant mené une étude de la fécondité de l’huître creuse dans le bassin d’Arcachon en 2013 en lien avec la qualité de l’eau) ont montré la présence d’huîtres avec des gonades peu développées à la fin du mois de juin dans le sud-est du Bassin, c’est-à-dire dans les zones situées en interne, notamment vers Comprian. Ces pourcentages ont pu atteindre les 60%. Au contraire, au Nord-ouest et au Sud-Ouest du Bassin, les pourcentages d’huîtres sans gonade développée sont faibles dans l’ensemble (Figure 29).

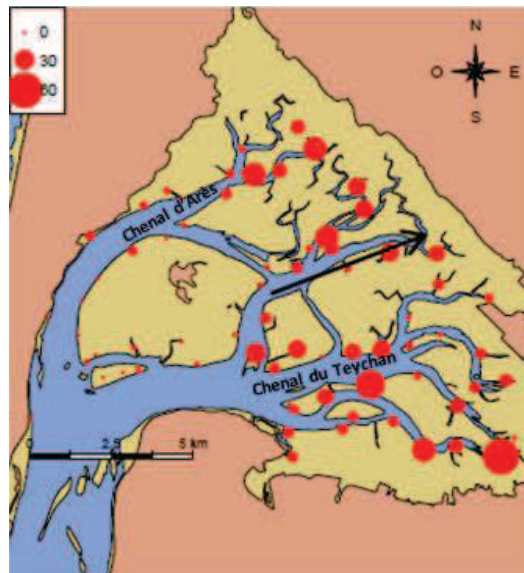


Figure 29 : Cartographie du pourcentage d’huîtres sans gonade développée à la fin du mois de juin. La flèche noire indique un gradient significatif au seuil de 5 %

Nous avons donc décidé pour la deuxième campagne de prélèvement en 2014, d’axer nos recherches sur deux autres sites bien distincts : Comprian, situé dans les eaux néritiques internes et au niveau du

## Chapitre 2-Bases méthodologiques

chenal du Teychan, et Les Jacquets, situé au Nord-ouest, au niveau du chenal d'Arès (Figure 30). De plus, Comprian se situe plus en interne, se rapprochant ainsi des débouchés de la Leyre ; l'un des vecteurs majoritaires de pesticides. Ces deux sites ont donc été choisis pour leur différence de maturation des gonades, mais aussi par le fait qu'ils sont situés au niveau de deux chenaux différents. La surface qui alimente le Teychan est plus importante que celle alimentant le chenal d'Arès, les volumes y sont donc plus importants : à marée descendante, le Teychan draine 2/3 des volumes d'eau sortant contre 1/3 pour le chenal d'Arès.

Au vu des problèmes rencontrés au cours de la première année d'étude (huîtres triploïdes notamment), nous avons décidé pour la deuxième campagne, de nous fournir auprès d'un seul et même ostréiculteur et de placer nous-mêmes les huîtres sur chaque site d'étude au mois de février.



Figure 30 : Carte du Bassin d'Arcachon représentant les deux sites d'études pour la période estivale 2014

## 2. Paramètres étudiés

Préalablement à chaque expérience, la salinité de l'eau de mer prélevée dans le Bassin d'Arcachon est mesurée à l'aide d'une sonde à salinité (Wissenschaftlich Technische Werkstätten Multi 340i, sonde TetraCon 325) : jusqu'à présent celle-ci est d'environ 33 u.s.i pour les eaux prélevées au Banc d'Arguin ( $32,75 \pm 1,47$  u.s.i). Partant de cette salinité de base, des dilutions à l'aide d'eau ultra pure ont été réalisées, afin d'obtenir les salinités désirées de 18, 21, 24, 27, 30 et 33 u.s.i. Ces salinités ont été choisies après étude des relevés de salinité de 2010 à 2014 (SOMLIT, 2015) en trois points du Bassin d'Arcachon : Bouée 13, Eyrac et Comprian (Figure 31). Celles-ci varient de 23 à 36 u.s.i en période estivale (Fig. 4). Des salinités inférieures de 18 u.s.i et 21 u.s.i ont été testées afin de s'assurer des limites d'utilisation du test embryo-larvaire. En parallèle, il s'agit de déterminer l'impact de la salinité sur les larves D, seule ou couplée à l'impact de polluants.

En effet, dans un second temps, l'effet du -S-métolachlore et du cuivre a été suivi à une salinité de 33 u.s.i puis à des salinités variant de 18 à 30 u.s.i. Pour cela, des concentrations en métolachlore ( $10 \text{ ng.L}^{-1}$  : concentration environnementales basses ;  $100 \text{ ng.L}^{-1}$  et  $1000 \text{ ng.L}^{-1}$ ) et en cuivre ( $0,5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  ;  $1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  : concentrations environnementales ;  $10 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  et  $50 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ) ont été testées.

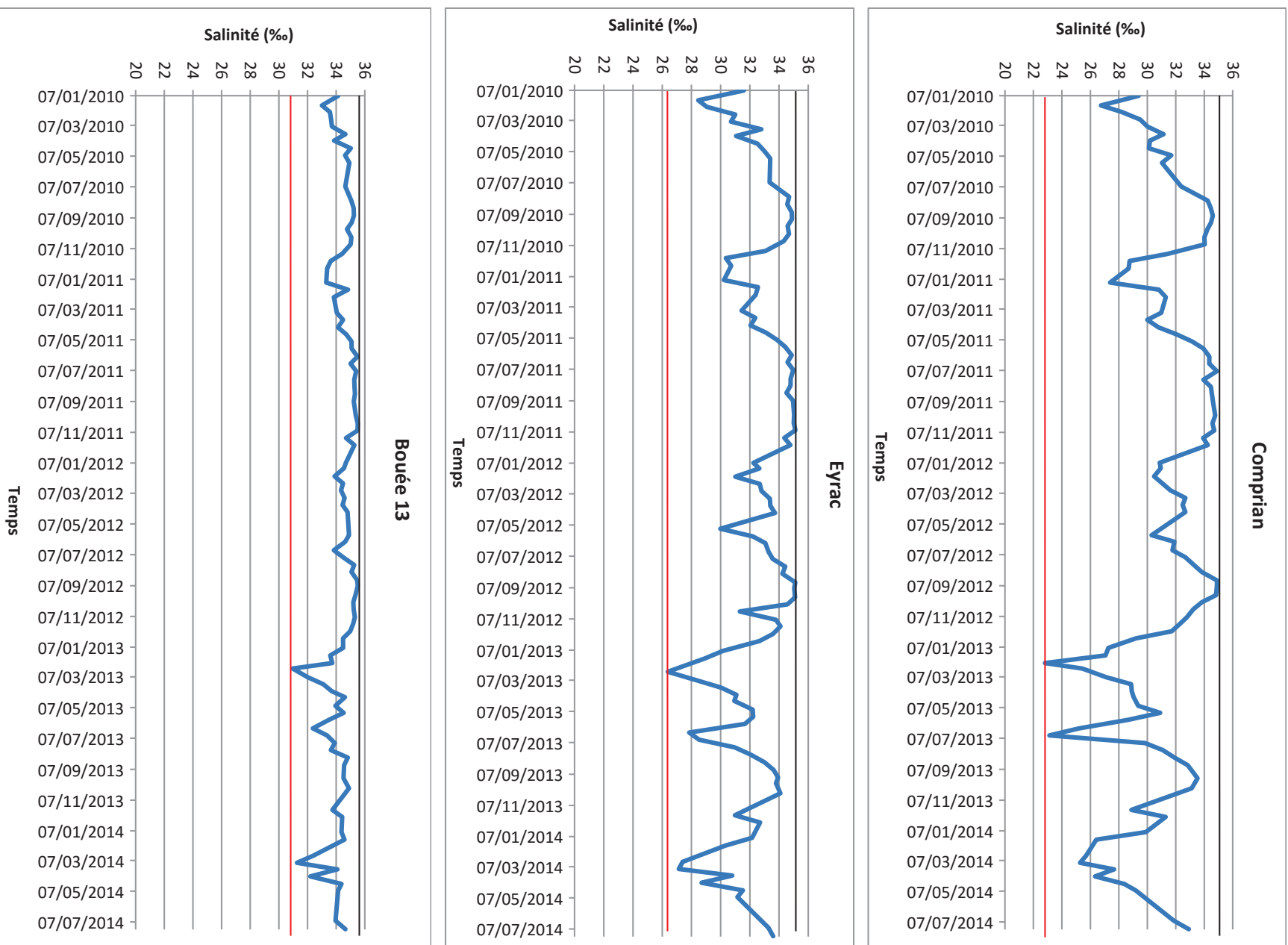


Figure 31 : Relevés de salinité par la sonde SBE19 en trois points du Bassin d'Arcachon au cours de la période 2010-2014. En rouge, les minimums observés, en noir les maximums



## Chapitre 2-Bases méthodologiques

Toutes les deux semaines, 30 huîtres cultivées sont prélevées à marée basse, ainsi que 30 huîtres sauvages situées à proximité. De l'eau de mer est collectée sur chacun des sites pour réaliser au laboratoire le test embryo larvaire.

Différents paramètres sont étudiés en complément du test embryo larvaire permettant de dénombrer les malformations larvaires (Tableau 10). L'analyse des contaminants organiques et métalliques (cf. § 2.3) est réalisée sur un pool de 10 individus cultivés ou sauvages des différents sites, au cours de la période de reproduction.

Le niveau de la contamination organique et métallique est aussi mesuré dans les eaux prélevées aux différents sites. Ces eaux sont celles utilisées dans les conditions témoins du test embryo-larvaire. Des dosages sont également réalisés sur les eaux supplémentées en contaminant (cuivre ou métolachlore aux différentes concentrations) afin de vérifier nos concentrations théoriques (cf. § 2.3).

Un examen histo-pathologique de la gonade a été réalisé au cours de la période de reproduction pour la campagne 2013 puis en amont de la période de reproduction au cours de la campagne 2014 au vu des résultats acquis précédemment. L'objectif est d'étudier le pourcentage d'occupation de la gonade en fonction des sites d'étude et des dates de prélèvement, mais aussi en fonction de leur mode de vie, sauvages ou cultivées (cf § 2.4)

Différents indices de conditions sont relevés sur les huîtres adultes : le sexe, le poids total (g), la longueur (mm), la largeur (mm), la hauteur (mm), le poids de la coquille vide (g) le poids frais (g) et l'état des réserves (Annexe 2).

Un suivi qualitatif et quantitatif des différentes classes des lipides est réalisé sur les larves D ainsi que sur les huîtres adultes. Une étude des réserves en glycogène est menée sur les huîtres adultes. L'ensemble de ces trois paramètres sont en cours d'analyse par Sonia Gasmi dans le cadre de sa thèse : Influence de la nourriture sur la reproduction de l'huître creuse dans le bassin d'Arcachon. La quantité d'ovocyte a également été suivie.

Au cours de la deuxième campagne, des critères ont été ajoutés afin de compléter notre étude. La mobilité des spermatozoïdes a été analysée selon des critères de visualisation microscopique : mobile ; très mobile ; peu mobile ; immobile.

Un test de toxicité sur les ovocytes et spermatozoïdes a été réalisé afin d'analyser le pourcentage de succès de fécondation en présence ou non de contaminants (cf § 2.2).

## Chapitre 2-Bases méthodologiques

Des larves ont été prélevées afin de réaliser une étude génétique (cf § 2.5) et épigénétique. Pour cette dernière analyse des prélèvements de branchies et de glande digestive ont également été effectués sur les géniteurs afin d'étudier les modifications épigénétiques potentiellement induites (cf § 2.6).

*Tableau 11 : Critères d'étude sur les huîtres natives du Bassin d'Arcachon au cours des deux campagnes de 2013 et 2014*

	2013	2014
Dosage des contaminants organiques et métalliques (géniteurs)	X	X
Malformations larvaires	X	X
Examen histopathologique de la gonade	X	X
Indice de condition	X	X
Etude du glycogène (géniteurs) et des différentes classes de lipides (larves et géniteurs)	X	X
Quantité d'ovocyte	X	X
Mobilité des spermatozoïdes		X
Succès de fécondation		X
Etude génétique (larves)		X
Etude épigénétique (branchies et glande digestive)		X

### 2.1. Le test embryo-larvaire

Le bioessai sur le développement embryo- larvaire est un test d'écotoxicité aquatique aiguë. Ce test embryotoxique a été décrit en détail dans la littérature par His et al. (1999), Geffard et al. (2002) et Quiniou et al. (2005) et a fait l'objet d'une normalisation en 2009 (AFNOR, 2009).

Pour des questions de logistique, les huîtres prélevées dans le Bassin sont conservées toute une nuit dans des glacières oxygénées à l'aide d'un bulleur à une température inférieure à 18 °C pour ne pas déclencher de frai, en attendant la réalisation du test embryo larvaire.

### 2.1.1. Milieu d'essai

Le test embryo larvaire est réalisé avec l'eau du Bassin d'Arcachon, quelle que soit la provenance des huîtres (milieu naturel ou d'écloserie). En période estivale, l'eau est prélevée au niveau des sites d'échantillonnage, le reste de l'année, lorsque des huîtres d'écloserie sont utilisées, l'eau est prélevée à Arguin. Ce site, classé réserve naturelle, est situé dans les passes de communication entre l'océan et le Bassin d'Arcachon. Ainsi, les eaux présentes au niveau de cette zone sont fortement diluées par l'apport quotidien des masses d'eaux océaniques. Il existe, par ailleurs, un fort gradient de contamination allant de l'extérieur du bassin vers l'intérieur. C'est pourquoi il est préférable d'utiliser des eaux les plus fortement exemptes de contamination, que l'on nommera : eau naturelle de qualité, comme préconisé par Quiniou et al. (2005).

Une fois prélevée sur le site, l'eau est ramenée au laboratoire puis filtrée au moyen d'un support de filtre NALGENE avec récipient récepteur en deux étapes. Dans un premier temps, une filtration à l'aide d'une membrane blanche en esters de cellulose mixtes composée d'acétate de cellulose et de nitrate de cellulose (fournie Atlantic labo ICS, Xilab) de 1,2  $\mu\text{m}$  de maille est utilisée puis dans un second temps, une membrane blanche (Xilab) de même nature et de 0.2  $\mu\text{m}$  de diamètre de pore. Cette filtration, préalable au test, permet d'éliminer les débris et microorganismes potentiellement présents dans l'eau, et qui pourraient venir perturber la réalisation du test embryo-larvaire.

Une fois filtrée, l'eau est conservée en chambre froide à 4 °C à l'abri de la lumière jusqu'à la réalisation du test le lendemain, ou au plus tard, le surlendemain. Le jour de l'expérience, l'eau est à nouveau filtrée à l'aide d'une membrane blanche de 0,2  $\mu\text{m}$ , pour s'assurer d'avoir une eau de qualité.

### 2.1.2. Préparation des différentes conditions d'exposition : contamination au cuivre ou au métolachlore

Les différentes concentrations en contaminant à tester sont réalisées à l'aide de l'eau prélevée au niveau du Bassin d'Arcachon, soit au niveau du Banc d'Arguin pour les huîtres d'écloserie, soit l'eau des différents sites étudiés pour les huîtres d'Arcachon. Dans l'optique d'étudier l'effet de la salinité couplé à celui des polluants, des solutions de contaminations sont préparées pour chacune des salinités.

#### Cuivre

A partir d'une solution mère à 250  $\text{mg.L}^{-1}$ , différentes concentrations (1  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  et 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) sont préparées par dilution avec de l'eau de mer naturelle filtrée. Des concentrations à des doses environnementales ont été sélectionnées (1  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) afin de déterminer l'impact réel de ce contaminant

présent dans les eaux du Bassin sur les stades larvaires. Des concentrations dix fois supérieures ont également été choisies afin de discriminer au mieux les effets de ce polluant, et des concentrations cinquante fois supérieures afin d'atteindre 100 % de malformations (Mai et al., 2014, 2012) et pouvoir déterminer les doses provoquant 50 % de malformations ( $CE_{50}$ ).

### **Métolachlore**

A partir d'une solution mère à  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ , différentes concentrations ( $10 \text{ ng.L}^{-1}$ ,  $100 \text{ ng.L}^{-1}$ ,  $1000 \text{ ng.L}^{-1}$ ) sont préparées par dilution avec de l'eau de mer naturelle filtrée. Des concentrations à des doses environnementales basses ( $10 \text{ ng.L}^{-1}$ ) ou élevées ( $100 \text{ ng.L}^{-1}$ ) ont été sélectionnées afin de déterminer l'impact réel de ce contaminant présent dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur les stades larvaires. Des concentrations plus élevées de  $1000 \text{ ng.L}^{-1}$  ont été sélectionnées afin de discriminer au mieux les effets de ce polluant.

2 mL de milieu sont ensuite introduits dans chaque plaque multipuits stériles (Cellstar, CatN° 662 160), à raison de quatre réplicats par condition étudiée. Ces puits serontensemencés avec les embryons obtenus au cours du test embryon larvaire, à raison de 250 à 300 par puit.

Une étude a été réalisée pour déterminer la cinétique d'adsorption des contaminants sur les parois des puits des microplaques en polystyrène traité. La concentration en contaminant dans les puits est suivie au cours de la période d'incubation (0h, 1h, 2h, 12h et 24h) à la salinité de 33 u.s.i. Pour cela, les micropuits ont été remplis à l'aide de 2 mL de la solution à la concentration désirée puis incubés, sans larve, à  $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Des prélèvements ont été réalisés dans plusieurs micropuits afin d'obtenir une quantité suffisante de solution pour l'analyse (30 mL pour chaque période d'incubation et chacun des polluants).

#### **2.1.3. Obtention des gamètes**

Pour obtenir les gamètes mâles et femelles, un processus de stimulation thermique des huîtres, plongées alternativement dans des bassines d'eau de mer de  $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$  et  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , joue le rôle d'inducteur (Figure 32, A et B). Dès l'observation d'une ponte, l'individu est isolé dans un bocal (Figure 32, C), contenant 500 mL d'eau de mer filtrée, à la température du bain ayant fait pondre les individus. Le frai de l'huître mâle se caractérise par un jet continu blanc tandis que l'huître femelle éjecte ses gamètes par des clappements des deux valves. Le sexage des produits sexuels obtenus est réalisé au microscope. Les gamètes femelles sont très facilement identifiables puisqu'ils présentent la forme d'une poire (Figure 32, D). Les gamètes mâles sont visibles sous la forme de petits spermatozoïdes plus ou moins actifs.

## Chapitre 2-Bases méthodologiques

Dans le cas où l'obtention des gamètes ne se fait pas par stimulation thermique, un stripping de la gonade peut être réalisé. Pour cela, le muscle adducteur de l'huître est sectionné, les tissus branchiaux sont dégagés puis la gonade est isolée dans un bocal, contenant 500 mL d'eau de mer filtrée. A l'aide d'un agitateur, de légers mouvements de pression de haut en bas de la gonade sont réalisés permettant ainsi la libération des gamètes.

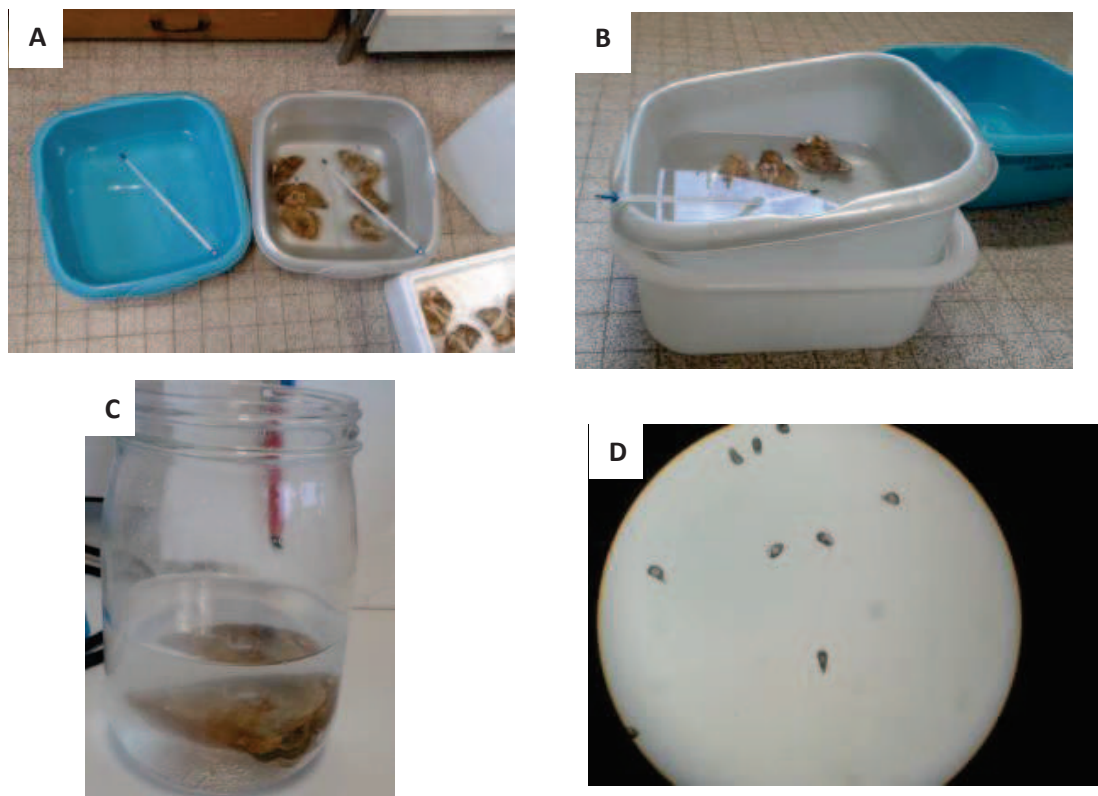


Figure 32 : A et B – Illustration des bains de stimulation thermique. C- Isolement des individus en cours de fraie. D-Vérification en microscopie de l'obtention de gamète femelle

### 2.1.4. Fécondation et ensemencement des œufs

La fécondation est réalisée par ajout, dans le bécher contenant les ovocytes, de quelques millilitres de la suspension de sperme. A l'aide d'un agitateur, le tout est homogénéisé. Un prélèvement est réalisé puis analysé en microscopie pour s'assurer du départ du globule polaire attestant de la bonne réalisation de la fécondation. Les œufs ainsi fécondés peuvent être ensemencés dans les microplaques, contenant les solutions des conditions d'étude, à raison d'un maximum de 250-300 œufs par micropuits de 2 mL. Pour cela, 5  $\mu$ L du mélange sont prélevés, puis, au microscope, le nombre d'ovocytes est dénombré. Ceci nous permet ensuite de déterminer la concentration en embryons produits par chaque couple et d'introduire la quantité nécessaire dans chaque puit.

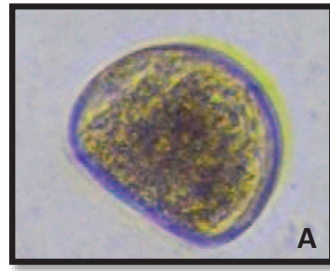
### 2.1.5. Incubation

Les microplaques sont placées dans une étuve à l'obscurité 24 heures à 24 °C, temps et températures idéales de développement des larves D de *Crassostrea gigas*. Dans le cas de l'étude d'impact des températures, différentes enceintes thermostatées sont réglées aux températures désirées, et les embryons mis à incuber dans ces différentes enceintes. A l'issue de cette période, les expérimentations sont stoppées par ajout de 25 µL de formol à 37 % par puits de 2 mL. Les analyses des larves malformées peuvent ensuite être effectuées sur l'instant ou ultérieurement par conservation des microplaques dans une chambre froide à 4 °C.

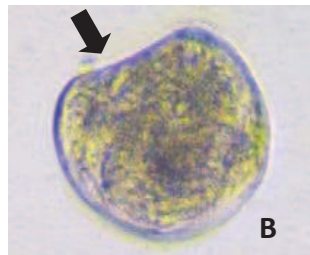
### 2.1.6. Analyses

A l'aide d'un microscope inversé (Nikon, Inverted Microscope Eclipse, TS 100/TS100-F, TS100LED MV/TS100 LED-F MV), au grossissement de 200, les larves D malformées peuvent être dénombrées. Pour cela les anomalies sont dénombrées sur 100 individus par répliquat. Différents types de malformations peuvent être visualisées (Figure 33). Les résultats des tests sont validés et exploitables uniquement si le taux de larves malformées en conditions témoins est inférieur ou égal à 20 % de larves D malformées. De plus, la sensibilité des larves vis-à-vis du cuivre sous sa forme  $\text{Cu}^{2+}$  est testée pour chaque couple de géniteurs afin de vérifier la sensibilité des géniteurs. Les solutions testées de 0 à 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , doivent, pour valider le test, indiquer une  $\text{CE}_{50}$  comprise entre 6 et 16  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

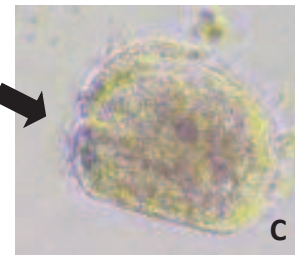
**Larve D normale**



**Anomalies de coquille**

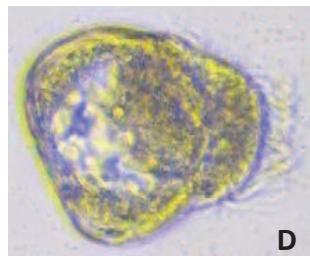


Charnière concave

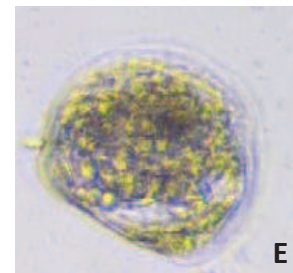


Echancrure

**Anomalies du manteau**

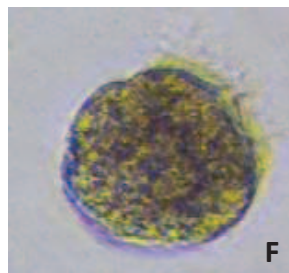


Hypertrophie avec expulsion



Manteau rétracté

**Anomalie de segmentation**



Anomalie/arrêt du développement

*Figure 33 : Test embryo-larvaire sur huître creuse. A - Larve D témoin à T 24h ne portant aucun signe de malformation. B et C - Anomalie de la coquille : la charnière peut être concave ou bien convexe ou la coquille présenter une échancrure. D et E - Anomalie du manteau : Le manteau peut être rétracté entre les valves de la coquille voire hypertrophié, pouvant aller jusqu'à l'expulsion. F - Anomalie de segmentation : L'embryogénèse est alors bloquée. Observations au grossissement X200*

## 2.2. Test de toxicité sur spermatozoïdes et ovocytes

Ce test supplémentaire permet d'évaluer la toxicité des deux polluants étudiés à un stade plus précoce du développement embryonnaire, du stade gamète jusqu'au stage 2/4 cellules. En effet, le cycle cellulaire est l'ensemble des étapes qui constituent et délimitent la vie d'une cellule et donc la vie de la future larve D. Nos hypothèses de travail pour cette étude sont que les polluants peuvent affecter les capacités d'interactions entre les spermatozoïdes et les ovocytes : capacité des spermatozoïdes à pénétrer la membrane des ovocytes ou atteintes des ovocytes eux-mêmes.

La solution de spermatozoïdes fraîchement filtrée sur papier sefar est introduite, à raison de 1 mL, dans un vial contenant 5 mL de chaque condition d'étude : condition contrôle (eau de mer filtrée), solution de cuivre à  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ , solution de métolachlore à  $100 \text{ ng.L}^{-1}$ . En parallèle, dans des microplaques de 24 puits, 2 mL de chaque condition d'étude sont introduits à raison de 4 réplicats par condition. Environ 250 à 300 ovocytes filtrés sont ajoutés dans chacun des puits. Les microplaques contenant les ovocytes et les vials contenant les spermatozoïdes sont ensuite mis à incuber 30 min à  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  à l'obscurité.

Trois essais de toxicité ont ensuite été menés (Tableau 11). Pour chaque essai, environ 10 spermatozoïdes pour un ovocyte sont introduits dans les puits de la microplaque. Le départ de la fécondation est vérifié toutes les 15 min jusqu'à ce que les ovocytes arrivent à leur premier clivage, soit environ 120 min (His et al., 1999).

Les embryons sont alors mis à incuber 2 heures à  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  à l'obscurité. Quand le stade 2/4 cellules est atteint en condition contrôle, 25  $\mu\text{L}$  de formol à 37 % sont ajoutés à chaque condition pour stopper la fertilisation ou le clivage et préserver les embryons en développement. Les ovocytes fécondés sont ensuite dénombrés à l'aide d'un microscope inversé (Nikon, Inverted Microscope Eclipse, TS 100/TS100-F, TS100LED MV/TS100 LED-F MV), au grossissement de 200.

Tableau 12 : Schéma expérimental du test de toxicité des spermatozoïdes et des ovocytes

	Spermatozoïdes non exposés	Spermatozoïdes exposés au cuivre	Spermatozoïdes exposés au métolachlore
Ovocytes non exposés	Essai A	/	/
Ovocytes exposés au cuivre	/	Essai B	/
Ovocytes exposés au métolachlore	/	/	Essai C



## 2.3. Dosage des contaminants

### 2.3.1. Le cuivre

Le cuivre a été dosé dans les eaux servant à la réalisation du test embryo larvaire. Pour cela, 30 mL d'eau ont été conservés à chaque date et site d'étude dans des tubes en polypropylène, puis acidifiés à 5 % à l'aide d'acide nitrique à 65 % (Sigma Aldrich), avant d'être conservé à 4 °C. Le cuivre a été également dosé dans la matrice biologique (pool de 10 huîtres). Les corps mous ont été extraits délicatement, tamponnés sur un essuie tout, puis broyés à 8000 tours.min<sup>-1</sup> puis 9500 tours.min<sup>-1</sup> (Ultra Turrax T2S, Janke et Kunkel, IKA Labortechnik). Le broyat obtenu a été réparti dans 4 tubes en polypropylène : deux servants à l'analyse des contaminants organiques et deux autres à l'analyse des contaminants métalliques. Ces échantillons sont ensuite congelés à -20 °C avant d'être analysés.

#### 2.3.1.1. Traitement des échantillons

Les échantillons d'huîtres adultes broyés sont décongelés et placés à l'étuve 48h au minimum à 45 °C afin d'éliminer l'eau. De cette manière, les résultats sont exprimés par rapport à la masse sèche, ce qui permet de s'affranchir des variations de teneur en eau liées à l'essorage du corps mou par exemple. Les échantillons sont ensuite digérés dans 3 mL de HNO<sub>3</sub> pur dans un milieu sous pression à 100 °C pendant 3h (hot block CAL 3300, Environmental Express, USA). Les digestats sont ensuite dilués dans 18 mL d'eau ultra pure (Milli-Q, Bedford, MA, USA).

Les échantillons d'eau conservés à 4°C sont homogénéisés puis dilués au tiers dans de l'acide nitrique 3% avant d'être placés sur les racks de la machine pour être analysés.

#### 2.3.1.2. Analyse des échantillons

Le cuivre est mesuré par spectromètre d'émission optique couplé à un plasma inductif (ICP-OES 720, Agilent Technologies). La concentration en métal dans le corps des individus est exprimée en mg/kg de poids sec. La validité de la méthode est vérifiée périodiquement avec du matériel certifié Tort-2 et Dolt-4 (hépatopancréas de homard et foie de roussette CNRC-CNRC, Ottawa, Canada) et les valeurs obtenues doivent être dans les gammes certifiées. La limite de détection pour le Cu dans la matrice biologique huître est de 0.005 mg.L<sup>-1</sup> et de 0.3 µg.L<sup>-1</sup> pour l'eau de mer.

Un ICP-OES, appareil qui résulte du couplage entre un plasma d'argon induit par haute fréquence et un spectromètre, est un instrument de mesure destiné à réaliser des analyses élémentaires par spectrométrie d'émission atomique. Pour cela, préalablement à la mesure, l'échantillon liquide est nébulisé en aérosol afin d'être introduit dans l'ICP. La première fonction du plasma est d'éliminer le solvant et transformer l'échantillon en particules microscopiques. Les étapes suivantes impliquent la

décomposition de ces particules en un gaz de molécules individuelles (vaporisation) qui sont alors dissociées en atomes (atomisation). L'échantillon est ensuite ionisé dans un plasma d'argon (6000-8000 °C). Les atomes de l'échantillon sont alors excités à un niveau énergétique supérieur par absorption de l'énergie du plasma. Cet état excité étant instable, le retour à l'état stable est alors accompagné de l'émission d'une série d'ondes électromagnétiques dans la gamme du spectre visible/UV caractéristique de chaque élément (raie atomique). Une partie des ions formés passent à l'état excité en absorbant une partie de l'énergie du plasma puis repassent à l'état fondamental ionique en réémettant l'énergie sous la forme d'une radiation lumineuse. Cette transition d'émission est appelée raie ionique. C'est la radiation lumineuse émise que l'on quantifie en ICP et dont l'intensité dépend directement de la concentration de l'élément dans l'échantillon (Figure 34).

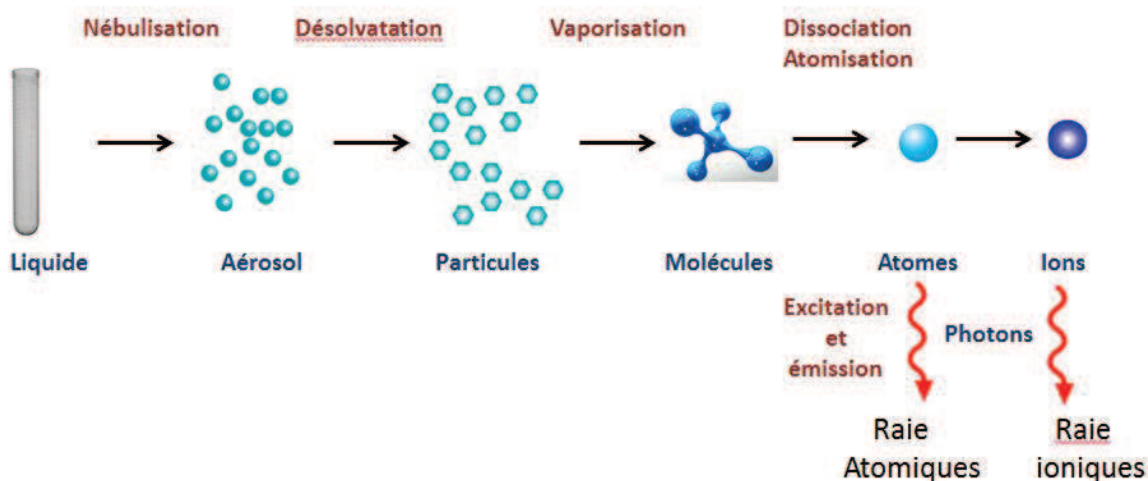


Figure 34 : Schéma des différentes étapes subies par l'échantillon par spectrométrie d'émission optique couplé à un plasma inductif

### 2.3.2. Le métolachlore

#### 2.3.2.1. Solutions de contamination

Le dosage du métolachlore est réalisé par chromatographie en phase liquide à l'aide d'un système HPLC infinity 1290 Agilent Technologies, couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle Agilent Technologies 6460. Les eaux à analyser sont dopées à l'aide d'une solution native à la concentration désirée. Trois blancs d'injection sont intercalés entre chaque échantillon afin de garantir un nettoyage optimal du système chromatographique entre chaque échantillon et prétendre atteindre des limites de détection aussi faibles que possible en s'affranchissant des contaminations croisées. Le métolachlore est quantifié à l'aide d'une transition de quantification. Sa présence est attestée grâce à

une transition de confirmation mais aussi grâce au rapport entre son abondance et celle de la transition de quantification. Les limites de détection et de quantification sont présentées dans le tableau 12.

Tableau 13 : Limite de détection (LD) et limite de quantification (LQ) du métolachlore au cours des différentes dates d'injection

	10 ng.L <sup>-1</sup>		100 ng.L <sup>-1</sup>		1000 ng.L <sup>-1</sup>	
	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ
<b>Métolachlore</b>	0,6	1,9	0,4	1,2	0,5	1,6

### 2.3.3.2. Dans les huîtres adultes

Au préalable, les échantillons, broyés au turax au moment de chaque campagne, sont décongelés, disposés dans des barquettes en aluminium et pesés afin d'obtenir le poids frais. Les échantillons sont refermés avec de l'aluminium puis recongelés avant d'être lyophilisés (Heto PowerDry LL3000, Thermo Scientific). La lyophilisation permet de s'affranchir de l'eau. Pour cela, les barquettes contenant les échantillons congelés sont placées dans le lyophilisateur. La congélation a permis de faire passer l'eau contenue dans le corps mou des huîtres de l'état liquide à l'état solide. Par abaissement de la pression dans l'enceinte de l'appareil, l'eau solide passe à l'état gazeux et s'élimine ainsi progressivement du corps mou. C'est la sublimation. Pour cela, 24h ont été nécessaires. Une fois cette étape terminée, les échantillons sont pesés afin d'obtenir le poids sec. Il est important de noter qu'au cours de ces deux campagnes, l'ensemble des prélèvements réalisés au cours des différentes dates ont été regroupés afin d'avoir plus de matière. Nous n'avons donc différencié que les sites. Les composés suivants ont été analysés dans les extraits d'huîtres récoltés au cours des deux campagnes 2013 et 2014 : 1-(2,4-Dichlorophenyl)urée (124 DCPU), 1-(3,4-Dichlorophenyl) urée (134 DCPU), 1-(3,4-Dichlorophenyl)-3-méthyl urée (1343 DCPMU), acétochlore, acétochlore ESA, acétochlore OA, alachlore, amethryn, atrazine, atrazine 2 hydroxy, azoxystrobine, bentazone, carbendazime, carbetamide, carbofuran, carbosulfan, chlorotoluron, chlorsulfuron, cyanazine, cyromazine, Atrazine-déséthyl (DEA), Atrazine-désisopropyl (DIA), diflufenican, dimétachlore, diuron, acide dimercaptosuccinique, N,N-diméthyl-N'-p-tolylsulphamide (DMST), flazasulfuron, fluazifop-p-butyl, flusilazole, hexazinone, hydroxy simazine, imidaclopride, irgarol, isoproturon, linuron, métazachlore, methiocarb, métolachlore, métolachlore ESA, métolachlore OA, metoxuron, metsulfuron-méthyl, nicosulfuron, promethryn, propachlore, propazine, propiconazole, prosulfuron, pyméthroline, quizalofop-éthyl, quizalofop-tefuryl, simazine, terbutryn, terbutylazine, terbutylazine déséthyl, thiaméthoxam. Leurs numéros d'enregistrement unique auprès de la banque de données de Chemical Abstracts Service (CAS) sont donnés en annexe (Annexe 3). Ces composés sont représentatifs de ceux couramment retrouvés dans les eaux du Bassin d'Arcachon. Ils sont analysés par LC/MS/MS via une méthode MRM

## Chapitre 2-Bases méthodologiques

en peak to peak, associée à un protocole d'extraction sur phase solide SPE (*Solide Phase Extraction*). Tout d'abord, 0,5 g de la matrice huîtres étudiées sont pesés, puis enrichis en étalon interne (alachlor d13, atrazine 2 hydroxy d5, atrazine d5, bentazone d7, carbendazime d3, carbetamide d5, carbofuran d3, chlorotoluron d6, DEA-d7, DIA d5, diuron d6, hexazinone d6, imidacloprid d4, irgarol d9, isoproturon D6, linuron d6, métolachlore d6, metoxuron d6, metoxuron d6, metsulfuron-methyl d3, nicosulfuron d6, promethryn d14, Propazine D14, Propazine D14, quizalofop-ethyl d3, quizalofop-ethyl d3, simazine d10, terbutryn D5, terbutylazine d5, terbutylazine desethyl d9, thiamethoxan d3) : 50 µL d'une solution à 63,3 ng.g<sup>-1</sup> sont introduits dans les échantillons. Un triplicat du 1<sup>er</sup> échantillon de la série est réalisé afin de s'affranchir de la variabilité du manipulateur. Pour tester l'efficacité de l'extraction, un échantillon supplémenté est utilisé. Il s'agit en l'occurrence de broyat d'huîtres issues d'un prélèvement d'octobre 2011 au niveau du Banc d'Arguin. Dans cet échantillon, 50 µL d'étalon interne sont introduits ainsi que 50 µL d'une solution native à la concentration de 63,3 ng.g<sup>-1</sup>. Dans l'ensemble de ces échantillons, un mélange de solvant (méthanol) et d'eau acidifié à pH 2 est ajouté jusqu'à atteindre un volume de 12 mL au total. Un blanc protocole ne contenant que du solvant (moitié méthanol moitié eau acidifié au pH 2) nous permet de caractériser la contamination que l'on pourrait récupérer dans la machine. Une fois l'ensemble des échantillons préparés, l'extraction par micro-ondes à extraction est réalisée à l'aide du mélange méthanol/eau 50/50 v/v. Cette extraction permet de dissocier la matrice et le mélange méthanol/eau/pesticide. Une extraction en phase solide est ensuite réalisée à l'aide d'entonnoir en verre dans lesquels ont été disposés des bouts de cotons nettoyés au préalable à l'aide de dichlorométhane puis séchés. Les échantillons sont rincés à l'aide de méthanol au maximum trois fois. Le solvant restant est éliminé à l'aide du Rapidvap Labconco à la température de 60 °C, à la vitesse de 80 speed, à la pression de 700 millibare pendant 60 min. Finalement, au bout de 5h d'évaporation nous avons décidé pour les échantillons de l'été 2014 d'évaporer le solvant au flux d'azote. Une fois évaporé, la dernière étape de l'extraction consiste à la retenue sur cartouche des éléments à doser. Les cartouches SPE utilisées pour l'extraction (Oasis<sup>®</sup> HLB, 3cc, 60 mg) sont conditionnées successivement avec 3 mL de méthanol et 3 mL d'eau acidifiée à pH 2 (HCl). Le passage des liquides au travers des cartouches est facilité par application d'un vide dans la cuve SPE disposée en aval. L'échantillon est ensuite percolé à son tour et les analytes sont alors retenus sur la phase réceptrice des cartouches. Les analytes et étalons internes sont ensuite élués de l'adsorbant avec 3 mL de méthanol. L'éluat qui est récupéré dans des flacons est évaporé sous flux d'azote pour être transféré dans des flacons d'injection avec restricteur de 300 µL. Les limites de détection et de quantification ont été calculées avec des rapports signal sur bruit supérieur à 3 ou 9 respectivement (Tableau 13 et 14).

Tableau 14 : Limite de détection (LD) et limite de quantification (LQ) du protocole SPE pour chacun des composés dosés dans la matrice huître de la campagne 2013

Composé	LD	LQ	Composé	LD	LQ
124 DCPU	1,3	3,8	flazasulfuron	1,0	3,1
134 DCPU	1,3	4,0	fluazifop-p-butyl	0,3	0,8
1343 DCPMU	9,9	29,8	flusilazole	1,9	5,7
acétochlore	28,2	84,5	hexazinone	0,3	0,8
acétochlore ESA	3,5	10,4	hydroxy simazine	0,8	2,4
acétochlore OA	4,4	13,1	imidaclopride	0,5	1,6
alachlore	1,8	5,5	irgarol	0,1	0,3
amethryn	0,2	0,7	isoproturon	0,2	0,5
atrazine	1,2	3,7	linuron	1,6	4,7
atrazine 2 hydroxy	0,9	2,6	métazachlore	0,3	1,0
azoxystrobine	0,4	1,2	methiocarb	0,2	0,6
bentazone	45,0	135,1	métolachlore	1,0	3,1
carbendazime	0,2	0,7	métolachlore ESA	1,6	4,9
carbetamide	0,3	0,9	métolachlore OA	1,4	4,2
carbofuran	2,3	6,8	metsulfuron-methyl	0,2	0,7
carbosulfan	0,6	1,7	nicosulfuron	1,0	3,0
chlorotoluron	0,4	1,3	promethryn	0,2	0,5
chlorsulfuron	1,3	4,0	propachlore	1,8	5,5
cyanazine	0,1	0,3	propiconazole	0,8	2,5
cyromazine	0,5	1,6	prosulfuron	1,6	4,7
DEA	4,6	13,9	pymethroline	0,6	1,7
DIA	2,3	6,9	simazine	1,7	5,2
diflufenican	0,7	2,1	terbutryn	0,1	0,3
dimétachlore	1,4	4,2	terbutylazine	0,4	1,2
diuron	2,0	5,9	terbutylazine desethyl	0,6	1,9
DMSA	0,5	1,5	thiamethoxan	0,2	0,7
DMST	0,5	1,4			

Tableau 15 : Limite de détection (LD) et limite de quantification (LQ) du protocole SPE pour chacun des composés dosés dans la matrice huître de la campagne 2014

Composé	LD	LQ	Composé	LD	LQ
<b>124 DCPU</b>	6,1	18,4	<b>flazasulfuron</b>	0,6	1,8
<b>134 DCPU</b>	1,5	4,4	<b>fluazifop-p-butyl</b>	0,2	0,6
<b>1343 DCPMU</b>	9,8	29,5	<b>flusilazole</b>	2,5	7,4
<b>acétochlore</b>	16,8	50,5	<b>hexazinone</b>	0,3	0,9
<b>acétochlore ESA</b>	2,2	6,7	<b>hydroxy simazine</b>	3,5	10,4
<b>acétochlore OA</b>	4,5	13,4	<b>imidacloprid</b>	0,3	0,9
<b>alachlor</b>	0,8	2,3	<b>irgarol</b>	0,1	0,4
<b>amethryn</b>	0,3	1,0	<b>isoproturon</b>	0,1	0,4
<b>atrazine</b>	1,2	3,7	<b>linuron</b>	2,1	6,4
<b>atrazine 2 hydroxy</b>	0,6	1,8	<b>métazachlore</b>	0,5	1,4
<b>atrazine d5</b>	4,3	12,9	<b>methiocarb</b>	0,2	0,5
<b>azoxystrobine</b>	0,3	0,9	<b>métolachlore</b>	0,3	0,8
<b>bentazone</b>	6,8	20,4	<b>métolachlore ESA</b>	1,9	5,7
<b>carbendazime</b>	0,4	1,3	<b>métolachlore OA</b>	1,4	4,2
<b>carbetamide</b>	0,2	0,7	<b>metsulfuron-methyl</b>	0,2	0,7
<b>carbofuran</b>	0,1	0,3	<b>nicosulfuron</b>	0,2	0,6
<b>carbosulfan</b>	0,6	1,8	<b>promethryn</b>	0,2	0,6
<b>chlorotoluron</b>	1,1	3,3	<b>propachlore</b>	0,9	2,6
<b>chlorsulfuron</b>	1,2	3,7	<b>propiconazole</b>	1,1	3,3
<b>cyanazine</b>	0,1	0,3	<b>prosulfuron</b>	1,7	5,1
<b>cyromazine</b>	1,1	3,4	<b>pymethroline</b>	4,0	12,1
<b>DEA</b>	1,3	3,8	<b>quizalofop-p-tefuryl</b>	2,0	5,9
<b>DIA</b>	1,5	4,4	<b>simazine</b>	1,2	3,6
<b>diflufenican</b>	1,0	3,0	<b>terbutryn</b>	0,1	0,3
<b>dimétachlore</b>	0,8	2,4	<b>terbutylazine</b>	0,5	1,6
<b>diuron</b>	1,1	3,4	<b>terbutylazine desethyl</b>	1,2	3,6
<b>DMSA</b>	0,4	1,1	<b>thiamethoxan</b>	0,2	0,7
<b>DMST</b>	0,3	0,9			

## 2.4. Etude histologique de la gonade

Pour identifier et déterminer l'état de maturation des gonades, une étude histologique a été réalisée sur les géniteurs prélevés aux différentes dates et sites d'étude. Plusieurs grandes étapes sont nécessaires à cette étude : coupe de tissu, déshydratation, mise en paraffine, inclusion et coloration.

### 2.4.1. Réalisation de la coupe gonadique

Cinq huîtres sauvages et cinq huîtres cultivées ont été prélevées à chaque date et chaque site. Chaque individu est disséqué afin d'isoler la gonade. Une coupe transversale est alors réalisée à l'aide d'instruments bien tranchants, afin de ne pas écraser les tissus et donc éviter la formation d'artefacts. La coupe est ensuite introduite dans une histocassette.

### 2.4.2. Fixation et déshydratation des tissus

Lors de leur prélèvement, les échantillons de gonades (chacun placé dans une histocassette annotée) sont immédiatement mis dans un bain de bouin (75 % d'acide picrique, 20 % de formol, 5 % d'acide acétique, eau) pendant plusieurs heures. Plus les échantillons sont gros (selon état de maturation de la gonade) plus le bain est long. Cette étape permet la fixation des tissus de l'échantillon par immobilisation des constituants tissulaires et cellulaires. Une fois réalisée, les échantillons sont rincés deux fois pendant 10 min à l'eau claire pour éliminer l'excédent de Bouin. Les échantillons subissent ensuite une étape de déshydratation qui se fait par une succession de bains :

- 2 bains à l'éthanol à 70° de 30 min chacun
- 1 bain à l'éthanol à 90° de 1h
- 2 bains à l'éthanol à 95° de 1h chacun
- 2 bains à l'éthanol absolu de 1h chacun
- 2 bains au chloroforme de 30 min chacun
- 1 bain de paraffine de 4 à 6h
- 1 bain de paraffine de 2-3h

Pour que la lumière puisse passer à travers le tissu à examiner, celui-ci doit être très fin. Les tissus étant mous, il faut leur donner une consistance solide. C'est le principe de l'inclusion en paraffine qui consiste à infiltrer et à enrober les tissus à examiner avec de la paraffine. Ces bains de paraffine sont réalisés dans de grands béciers disposés dans une étuve à 56 °C permettant à la paraffine de rester sous un état liquide permanent. Le premier bain de paraffine est un bain de pré-imprégnation, qui va permettre d'éliminer l'excédent de chloroforme. Le deuxième bain est celui d'imprégnation de la

## Chapitre 2-Bases méthodologiques

paraffine dans les tissus. A l'issue de ces deux bains, les échantillons sont sortis un par un pour l'inclusion. Pour cela, de la paraffine à 65 °C est coulée dans un moule en plastique contenant l'échantillon puis l'ensemble est mis à sécher à l'air libre jusqu'au lendemain pour pouvoir être démoulé. Les tissus sont ainsi prêts à la coupe.

### **2.4.3. Réalisation des coupes**

Avant de débiter, des lames (76 x 26 mm) qui viendront accueillir les coupes de tissus sont disposées sur une plaque chauffante (Barnstead Electrothermal), à raison de trois répliquats par échantillon. Sur celles-ci sont notées les références de l'échantillon. Une goutte de glycérol gélatiné est disposée au centre et étalé à l'aide du doigt. De l'eau distillée est ensuite ajoutée dessus à l'aide d'une transpipette, de façon à recouvrir entièrement la lame. Ces lames sont laissées sur la plaque chauffante en attendant d'accueillir les échantillons de coupes.

Celles-ci sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leica RM 2145). Les coupes doivent être de 7 µm d'épaisseur afin de pouvoir être observées en microscopie photonique. Un ruban de coupes sériées de prélèvement tissulaire se produit au moment de la coupe, puis disposé sur les lames préparées préalablement. A l'aide d'un sopalin, l'excédent d'eau est éliminé. Les lames sont ensuite mises à l'étuve à 60 °C afin de faire fondre la paraffine restante, avant de les stocker en attendant la coloration.

### **2.4.4. Coloration et montage des coupes**

La coloration de tissus biologiques est nécessaire pour différencier les tissus présents sur la coupe de l'échantillon. Cette étape nécessite cinq grands points : le déparaffinage, l'hydratation, la coloration, la déshydratation et le montage. Les quatre premières étapes correspondent à une succession de bains (Tableau 15).

Les premiers bains de toluène et d'éthanol à concentrations décroissantes servent à réhydrater les coupes afin qu'elles imprègnent à posteriori les colorants. L'hématoxyline va permettre de colorer les noyaux en bleu/noir, la fuchsine, le cytoplasme en rose et le bleu d'Aniline, les tissus conjonctifs en bleu, par la coloration des fibres élastiques et de collagène. Les bains d'acides phosphomolybdique et phosphotungstique et une solution d'acide acétique à 1 % permettent de préparer les échantillons aux colorations suivantes. Enfin, les deux bains d'éthanol à 100° et de toluène sont utilisés afin de déshydrater à nouveau les coupes. Le dernier bain de toluène sert de bain d'attente pour le montage des lames.



Tableau 16 : Les différentes étapes de coloration des tissus biologiques

<b>Déparaffinage</b>	Toluène 1	3 minutes
	Toluène 2	3 minutes
	Toluène 3	3 minutes
<b>Hydratation</b>	Ethanol 100 °	3 minutes
	Ethanol 95 °	3 minutes
	Ethanol 95 °	3 minutes
	Ethanol 90 °	3 minutes
	Ethanol 70 °	3 minutes
	Eau courante	5 minutes
<b>Coloration</b>	Hématoxyline de Weigert	3 à 5 minutes
	Eau courante	5 minutes
	Eau déionisée	Rinçage
	Biebrich-scarlet-Fushine acide	5 minutes
	Eau déionisée	Rinçage
	Acide phosphomolybdique	5 minutes + Jeter
	Bleu d'Aniline	5 minutes
	Eau acétique 1%	Différencier 2 minutes + Jeter
	Eau distillée	Rinçage
<b>Déshydratation</b>	Ethanol 100°	3 minutes
	Toluène 1	3 minutes
	Toluène 2	Bain d'attente montage

Le montage entre lame et lamelle se fait de la façon suivante. A l'aide d'une tige en verre, une goutte d'Eukitt est déposée sur la lame et une lamelle est déposée sur le tout. A l'aide d'une pince courbe, les bulles d'air sont chassées par de légers appuis. Les lames sont ensuite séchées et stockées en attente de lecture.

#### 2.4.5. Mesures du pourcentage d'occupation gonadique

Le logiciel Leica Application Suit permet d'effectuer l'acquisition des images et leur traitement. Deux champs d'étude sont analysés pour chaque échantillon. Sur chaque champ sont mesurés l'aire gonadique et l'aire tissulaire à l'aide de l'outil surface. Les mesures obtenues sont ensuite exportées sur un fichier Excel répertoriant chaque surface mesurée et leur somme. Ces données permettent de calculer le pourcentage d'occupation de la gonade à l'aide de la formule :

$$\frac{\text{surface gonade}}{\text{surface tissulaire} + \text{gonadique}} \times 100$$

Les moyennes de ces pourcentages sont ensuite calculées pour les huîtres d'un même sexe, provenant d'un même site et vivant dans les mêmes conditions (sauvages ou cultivées).

## 2.5. Génétique

### 2.5.1. Protocole d'obtention de larves en grande quantité

Afin d'étudier l'expression génétique différentielle des larves D, 5 réplicats contenant environ 30 000 larves D chacun sont nécessaires. Un protocole expérimental a été mis en place afin de permettre le développement de larves D en grande quantité. Pour cela de grands contenants de 3L d'eau de mer sont utilisés, oxygénés à l'aide de bulleurs et disposés dans une pièce à la température de 24 °C subissant un rythme nyctéméral de 24h (Figure 35).

Des conditions témoins ont été étudiées ainsi que des conditions de contamination à des concentrations environnementales : 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  théorique de cuivre et 100  $\text{ng.L}^{-1}$  théorique de métolachlore. Les expositions ont été réalisées dans des contenants en plastique de 3L d'eau de mer filtrée puis des aliquotes d'eau ont été prélevés pour doser l'état de contamination au temps T 0h.

Une fois la fécondation des huîtres réalisée, 500 000 œufs fécondés issus d'un seul couple de géniteurs sont sélectionnés afin d'être introduits dans les bouteilles de 3L. Des expériences ont été menées au préalable dans différents contenants, avec des rapports quantités d'eau / quantités de larves variables. Différentes conditions d'incubation ont été testées : dans le noir pendant 24h ou avec un rythme nyctéméral, sous agitation ou non, avec bulleur ou non. Il s'est révélé que l'agitation n'améliorait pas l'obtention de larves D. Le bulleur s'est révélé nécessaire pour oxygéner l'eau et remettre en suspension les larves. Finalement, ces essais préliminaires nous ont menés au protocole détaillé.

Après 24h d'incubation, un échantillon d'eau est prélevé afin de s'assurer de la présence de larves D. Une partie de l'eau est conservée pour réaliser des dosages des contaminants métallique et organique à T24H. L'eau est ensuite filtrée sur 40  $\mu\text{m}$  afin de retenir les larves D. Le filtre est rincé à l'aide d'eau de mer filtrée et les larves sont récupérées dans un tube de 50mL. 5 aliquotes d'environ 30 000 individus sont prélevés pour l'étude génétique. Le reste de culture est utilisé pour l'étude épigénétique. Les tubes sont centrifugés, le surnageant est jeté et le culot remis en suspension à l'aide de 500  $\mu\text{L}$  de RNA Later, puis transféré dans des eppendorf de 1,5 mL. Les échantillons sont conservés à - 80 °C en attente d'analyse.

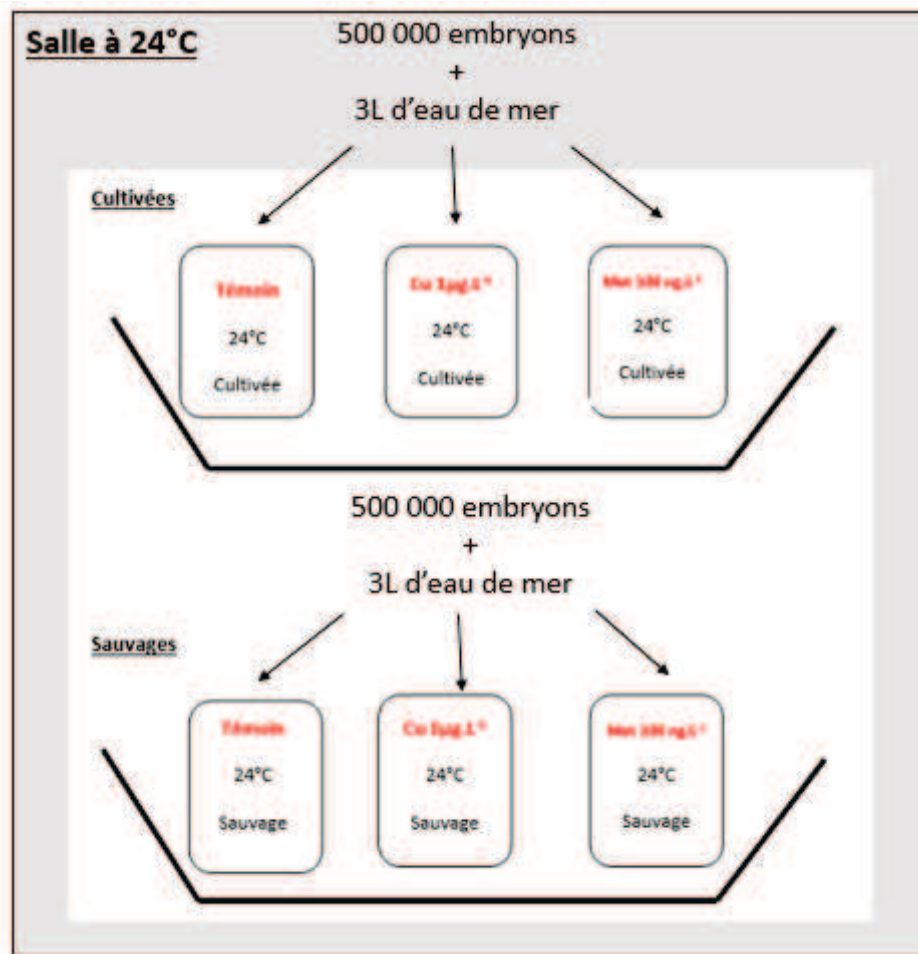


Figure 35 : Schéma de synthèse du développement de larves en grande quantité. Des contenants de 3L d'eau de mer ont été placés dans une salle maintenue à 24 °C. 500 000 embryons sont introduits dans chacune de ces bouteilles correspondant aux différentes conditions d'exposition : Témoin, 1 µg.L<sup>-1</sup> de cuivre, 100 ng .L<sup>-1</sup> de métolachlore

### 2.5.2. Principe de la qRT-PCR en temps réel

La RT-PCR a notamment été développée pour permettre la détection et la mise en évidence de l'accumulation d'un ARNm dit rare (Tagu and Moussard, 2003). La PCR est une technique qui consiste à amplifier une séquence génique bien définie. Pour cela il va s'agir, dans une première étape, d'extraire les ARN messagers (ARNm) totaux des échantillons étudiés (cf. § 2.5.2.1) puis, dans une deuxième étape, de les rétro-transcrire, c'est-à-dire de les copier *in vitro*, en ADN complémentaire (ADNc) monocaténaire : c'est la RT c'est-à-dire la rétro-transcription (cf. § 2.5.2.2). C'est à partir de cet ADNc de chaque échantillon que l'amplification sera réalisée, c'est-à-dire la multiplication de la séquence génique (cf. § 2.5.2.3). Les molécules d'ADN obtenues servent de matrice à la réaction de PCR utilisant un couple d'amorces spécifiques de la séquence de l'ARN d'intérêt (Figure 36).

### 2.5.2.1. Extraction des ARN totaux

Cette première étape consiste à extraire les ARN totaux de la matrice biologique, à savoir les larves d'huîtres, à l'aide du kit « SV Total RNA Isolation System » (Promega). Pour cela, les 30 000 larves préalablement conservées dans 500 µL de RNA Later sont décongelées. Les tubes sont centrifugés puis le surnageant retiré à l'aide d'une pipette. Les larves sont remises en suspension dans 800 µL de Trizol (Trizol Reagent, life Technologie). Ce mélange est transféré dans des tubes de 1,5 mL dans lesquels sont introduits 200 µL de microbilles (0,10 - 0,11 mm de diamètre, B. Braun Biotech International). Les tubes sont conservés dans la glace, puis, un à un, vortexés 3 x 50 s afin de libérer les contenus cellulaires. 500 µL de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25 :24 :1 v/v) (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri) sont ajoutés aux broyats afin d'éliminer les protéines hydrophobes et amphiphiles. L'échantillon est homogénéisé au vortex 10 s et centrifugé 5 min à 15 000 g à température ambiante. Cette étape permet de différencier trois phases différentes : une phase inférieure contenant les protéines hydrophobes, une phase intermédiaire où sont présentes les protéines amphiphiles et une phase supérieure contenant les protéines hydrophiles et les acides nucléiques (ADN, ARN). La phase aqueuse supérieure est isolée à la pipette dans des tubes RNase free puis additionnée avec 450 µL d'éthanol à 75 % et déposée sur une colonne d'affinité. Cette étape permet de favoriser les liaisons ioniques lors du dépôt de l'échantillon sur microcolonnes d'affinité. Après centrifugation 1 min à 13 500 rpm, la colonne est lavée à l'aide de 600 µL d'une solution de lavage « RNA wash solution ». Deux étapes de centrifugation de 1 min et 2 min à 15 000 g permettent de laver puis sécher la colonne. Le filtrat est jeté puis 50 µL d'un mélange de Yellow Core Buffer, MnCl<sub>2</sub> [90 mM] ; DNase I [1 U/ µL] sont déposés sur chaque échantillon (40µL-5µL-5µL) permettant de dégrader l'ADN fixé sur la colonne au cours d'une incubation dans un bain-marie à 37 °C pendant 15 min. Trois étapes d'élimination des débris d'ADN, et de DNase sont alors effectuées à l'aide de 200 µL de DNase Stop solution, puis de 600 µL et 250 µL de RNA Wash solution. A chaque ajout, l'échantillon est centrifugé 1 min à 15 000 g ou 2 min pour le dernier rinçage afin de sécher la colonne contenant les ARN et les filtrats sont jetés. La colonne est ensuite transférée sur des tubes propres et 50 µL de Nucléase Free-water sont ajoutés. Après centrifugation 1 min à 15 000 g, les ARN purifiés se trouvent élués au fond du tube, les colonnes pouvant alors être jetées. Les échantillons sont directement rétro-transcrits ou peuvent être stockés à -80 °C.

### 2.5.2.2. Rétro-transcription des ARN totaux en ADNc

Ce processus permet de synthétiser un brin d'ADNc à partir des ARN totaux extraits préalablement à l'aide d'une ADN polymérase ARN dépendante : la Réverse Transcriptase. Cette manipulation est réalisée à l'aide du kit « GoScript Reverse Transcription System » (Promega) à partir de 10 µL d'ARN totaux (environ 3µg). 1 µL d'une solution d'oligo dT [1 µM], 1 µL d'une solution d'hexanucléotides [1

## Chapitre 2-Bases méthodologiques

$\mu\text{M}$ ] servant d'amorces sont ajoutés aux ARN totaux. L'échantillon est placé dans un thermocycleur (Eppendorf Mastercycler) pendant 5 min à 70 °C puis 5 min à 4 °C pour linéariser les ARN et permettre aux amorces (hexaprimers et oligodT) de s'y fixer. 8  $\mu\text{L}$  d'un mélange contenant : 1  $\mu\text{L}$  de reverse-transcriptase [1U/ $\mu\text{L}$ ], 4  $\mu\text{L}$  de GoScript 5x reaction buffer, 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  [25 mM], 1  $\mu\text{L}$  de PCR Nucleotide Mix [10 mM] et 0,5  $\mu\text{L}$  de Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor sont ajoutés dans chaque tube et homogénéisés. L'échantillon est alors placé au thermocycleur pendant 5 min à 25 °C, puis 1h à 42 °C. Cette étape permet la synthèse des brins d'ADNc. Les ADNc ainsi obtenus peuvent être utilisés comme matrice lors des réactions de PCR quantitative en temps réel, ils sont conservés à -20°C en attente d'analyse.

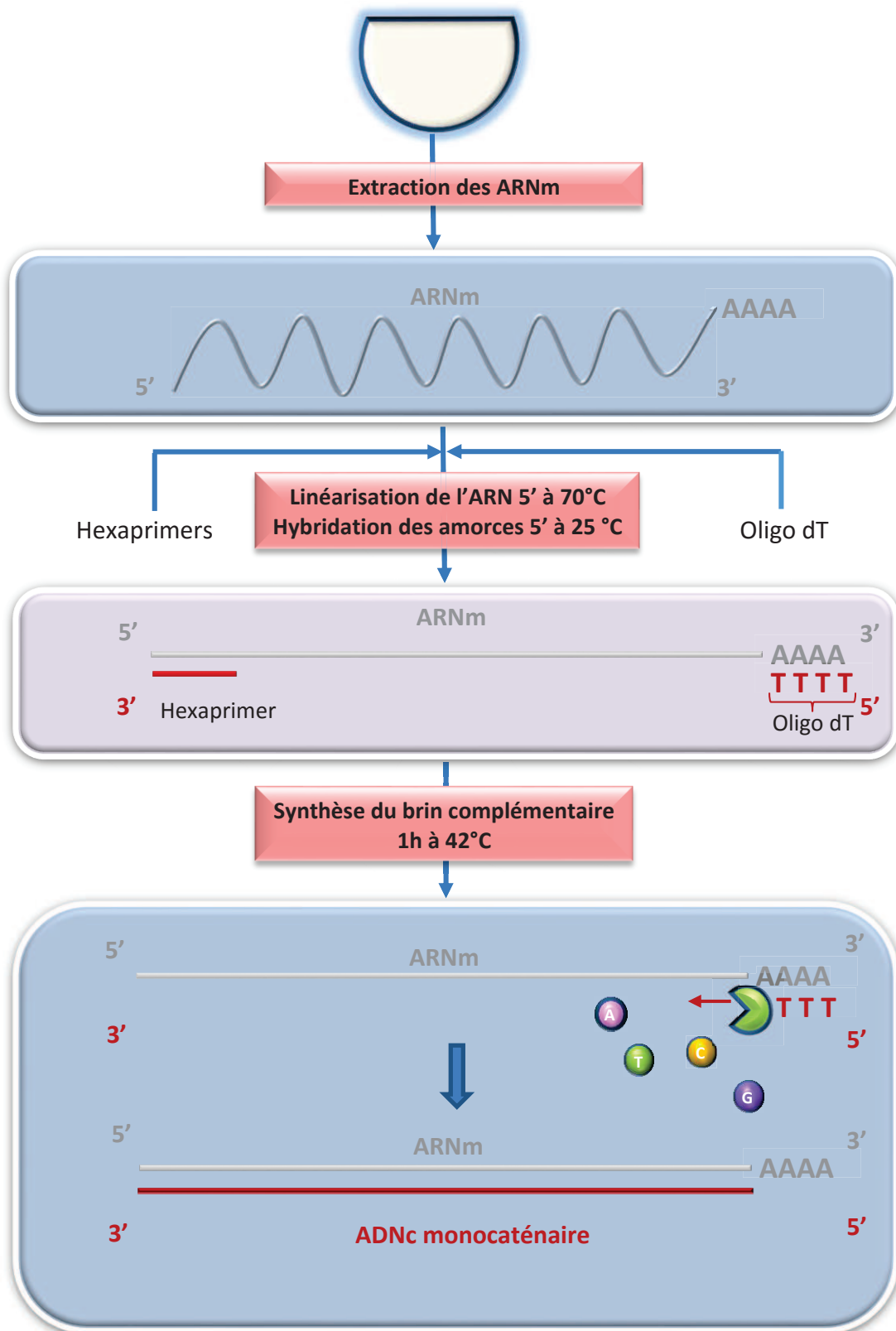


Figure 36 : Principales étapes de la rétro-transcription des ARNm en ADNc –Extraction des ARNm des larves D puis linéarisation de l'ARNm à 65°C. Hybridation des amorces oligodT et hexaprimers à 25°C . Synthèse du brin complémentaire d'ADNc monocaténaire après ajout de la RT et des désoxyribonucléotides (A,T,C,G) pendant 1h à 42 °C

### 2.5.2.3. PCR-quantitative en temps réel

Cette technique permet d'amplifier *in vitro* des séquences d'ARN, préalablement rétro transcrites, par répétition de réactions d'élongation à l'aide d'amorces nucléotidiques spécifiques et d'une ADN polymérase. L'objectif est d'obtenir une quantité suffisante d'ADN afin de pouvoir l'étudier. Une amplification PCR repose sur la répétition de trois processus :

- la dénaturation des brins d'ADN
- l'hybridation
- l'élongation

La dénaturation consiste à séparer les deux brins de l'ADN à une température élevée de 95 °C pendant 30s, afin d'obtenir des molécules d'ADN monocaténaïres. Des amorces nucléotidiques complémentaires d'une séquence de l'ADN monocaténaire vont ensuite venir se fixer au cours de l'étape d'hybridation. Pour cela la température est ramenée entre 55 °C et 60 °C pendant 30s, permettant une bonne fixation des amorces. Commence ensuite la synthèse du brin d'ADN complémentaire par la *Taq* polymérase à 72 °C pendant 30s. Cette enzyme a été isolée de la bactérie *Thermus aquaticus* YT1, une eubactérie thermophile vivant dans les sources chaudes du Yellowstone national Park (70 à 75 °C) (Tagu and Moussard, 2003). Cette enzyme est constituée d'un seul polypeptide avec un poids moléculaire d'environ 94 kDa. Lors de la réaction de PCR, 40 cycles d'amplification se succèdent. Ainsi, à chaque cycle, le nombre de copie du fragment d'ADN est multiplié par 2 ;  $2^n$  molécules étant obtenus après n cycles. La PCR-quantitative en temps réel permet de suivre la cinétique des amplifications grâce à un intercalant de l'ADN, le SYBR green, fluorochrome émettant de la fluorescence à 530 nm (vert) une fois intercalé dans de l'ADN double brin. L'intensité du signal de fluorescence est donc directement proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisé au cours de la réaction. L'appareil est alors capable de suivre l'évolution de la PCR en temps réel. Ceci permet d'établir une courbe d'amplification dont le profil peut se décomposer en 3 étapes (Figure 37) :

- une première étape de phase de latence ou de bruit de fond
- une seconde étape de phase exponentielle
- une dernière étape de phase de plateau

La phase de latence s'achève lorsque le nombre de produits PCR néo formés dépasse la valeur seuil de la technique de détection utilisée. Vient ensuite la phase exponentielle correspondant au doublement du nombre de produits PCR au cours de chaque cycle. C'est dans cette partie de la courbe de PCR que

la quantification peut être réalisée. Enfin, la phase de plateau débute lorsque les constituants de la PCR (en particulier la Taq polymérase) deviennent limitants.

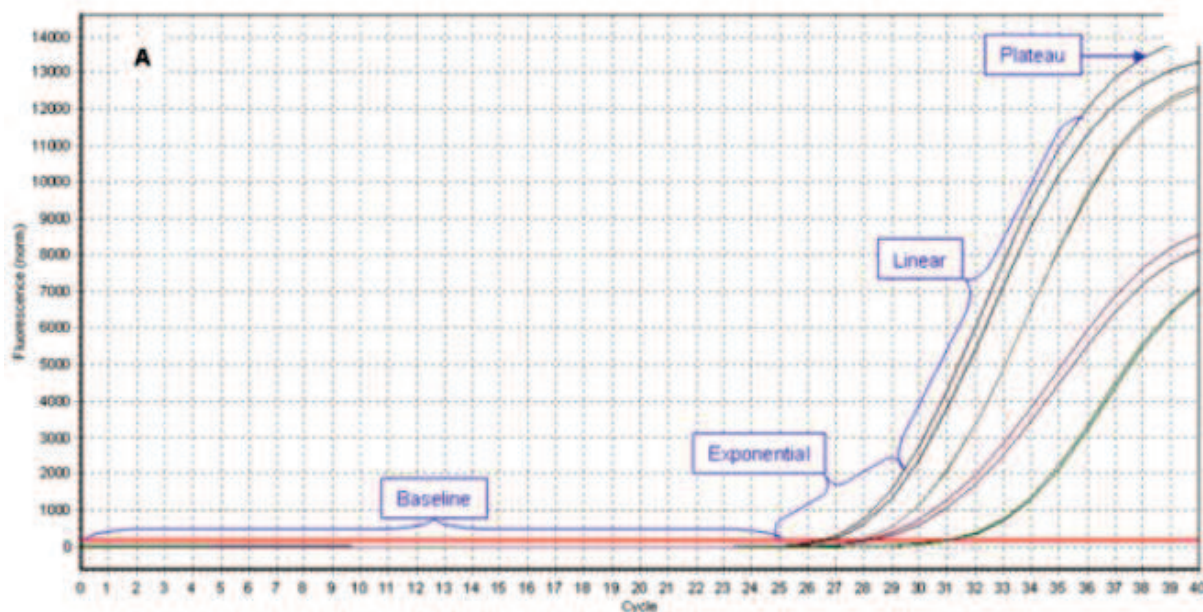


Figure 37 : Courbe d'amplification obtenues par PCR (issu du site <http://www.sigmaaldrich.com/>)

Une fois l'amplification terminée, l'appareil couplé au logiciel détermine la courbe de fusion de chaque amplicon par élévation progressive de la température de 65°C à 95°C. Pour cela à la fin de la PCR, la courbe de fluorescence est suivie lors de l'augmentation progressive de la température jusqu'à atteindre la température où tous les ADN double brin se séparent. À un amplicon donné, correspond une température de « fusion » donnée ( $T_m$ ).

La réaction de PCR a été réalisée dans un thermocycleur MX3000P (Stratagène). Chaque réaction de PCR, réalisée dans des plaques de 96 puits, comprend, 17  $\mu\text{L}$  de mix réactif (10  $\mu\text{L}$  de Tp 2x (Syber green, Taq polymérase, dNTP,  $\text{MgCl}_2$ ), et 7  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ ), 2  $\mu\text{L}$  d'un mélange d'amorces sens et anti-sens spécifique de chaque gène (2  $\mu\text{M}$  final chacune) et 1  $\mu\text{L}$  d'ADNc de l'échantillon correspondant. Le programme d'amplification commence par une activation de l'enzyme (95°C pendant 10 min) suivie de 40 cycles de PCR : 95 °C 30s ; 55 °C 30s ; 72 °C 30s.

#### 2.5.2.4. Evaluation des niveaux d'expression génique

Le niveau d'expression de chaque gène est déterminé par rapport à celui des gènes de référence ( $\beta$ -actine, EF1- $\alpha$  et Rpl7) dont l'expression est stable et ne présente pas de variation en fonction des traitements expérimentaux appliqués. La différence des moments de sortie ( $\Delta\text{Ct}$ ) entre la moyenne des gènes de référence et le gène d'intérêt est calculée selon la méthode décrite par Livak et Schmittgen, 2001 :



$$2^{-\Delta Ct}$$

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

Les Ct correspondent au nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence émise dépasse significativement le niveau basal permettant alors une détection par l'appareil. Le Ct représente donc le nombre de cycles n nécessaires pour atteindre le début de la phase exponentielle de la courbe de PCR qui est dépendante du nombre de copies initiales de la cible. Moins il y a de copie de gène au départ, plus le Ct sera élevé. Les Ct ont été obtenus par le logiciel MxPro-Mx3000P.

Pour comparer par la suite des conditions d'exposition aux facteurs environnementaux ou aux polluants à des conditions contrôles, le facteur d'induction FI est calculé selon la formule :

$$FI = \frac{2^{-\Delta Ct \text{ contaminé}}}{2^{-\Delta Ct \text{ contrôle}}}$$

## 2.6. Epigénétique

Des larves D sont conservées pour réaliser une étude épigénétique. Les individus parents ayant permis l'obtention des larves ont également été disséqués afin de récupérer 20 mg de branchies et 20 mg de glande digestive à la fois sur les mâles mais aussi sur les femelles. Deux réplicats de chaque prélèvement sont réalisés (Figure 38). 500 µL de RNA Later sont ajoutés puis les échantillons sont conservés à - 80 °C en attente d'analyse.

Nous nous intéresserons uniquement au taux de méthylation de l'ADN, principale modification épigénétique de l'ADN en rapport avec l'empreinte parentale. Cette modification consiste en l'ajout d'un groupement méthyle (-CH<sub>3</sub>) à la place d'un atome d'hydrogène au niveau d'un azote ou d'un carbone de la molécule d'ADN. Ces analyses étant toujours en cours, elles ne seront pas développées dans le cadre de ce manuscrit.

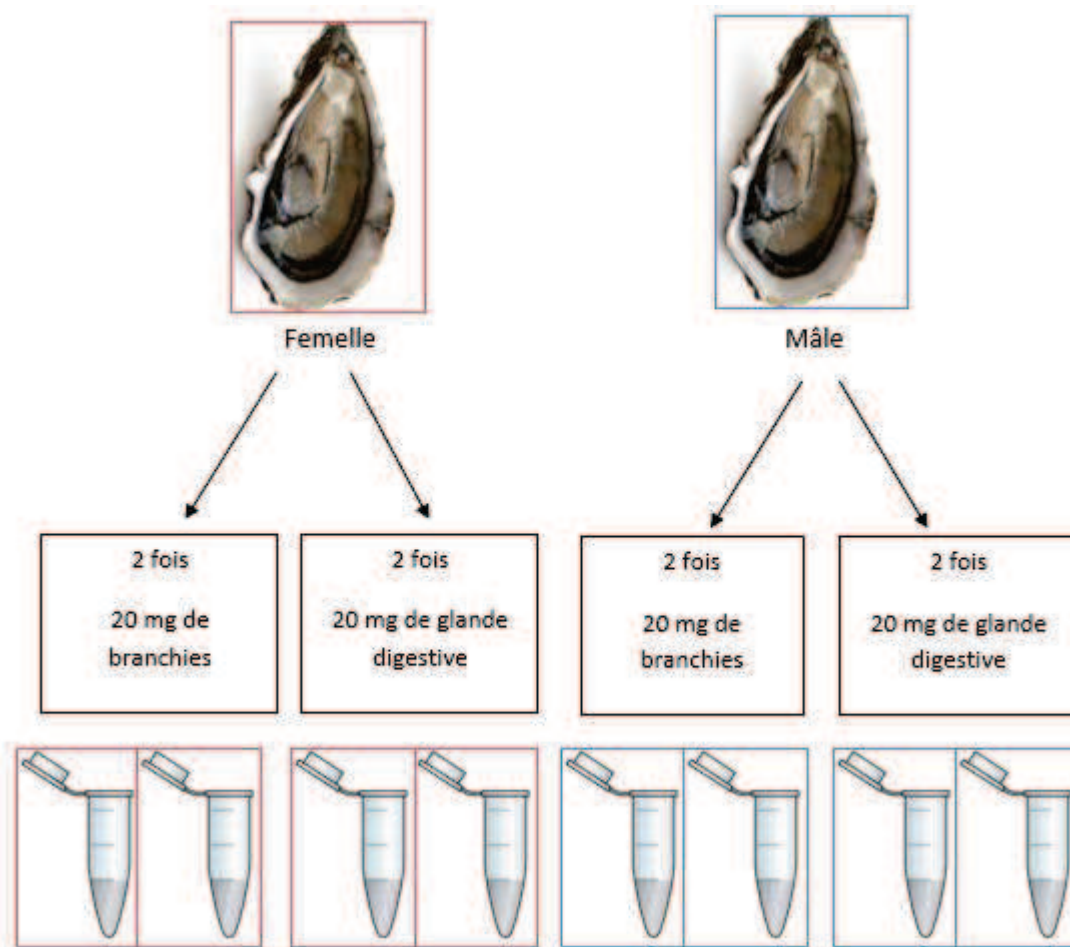


Figure 38 : Protocole de prélèvement des branchies et de la glande digestive sur les géniteurs

### 3. Développement d'un système d'analyse comportemental

Un système d'analyse du comportement larvaire a été développé dans le cadre de cette thèse. L'objectif principal était de pouvoir déterminer la vitesse de nage ainsi que les différents mouvements réalisés par les larves en fonction des différents traitements imposés : en présence ou non des différents contaminants, en fonction des températures d'exposition, en fonction des différentes dates de prélèvements. Pour cela le logiciel ImageJ a été utilisé et un plugin ainsi qu'une macro, spécifiques à notre étude, ont été développés en collaboration avec Alicia Romero-Gomez (Laboratoire EPOC, équipe ECOBIOC). Ce logiciel a été développé par le National Institute of Health (NIH). Il est écrit en Java, ce qui lui assure une compatibilité sur une large gamme de machines (<http://imagej.nih.gov/ij/docs/intro.html>). Les éléments développés dans le cadre de cette étude seront traités dans le chapitre 7.

#### 4. Statistiques

Chacune des conditions a été répliquée quatre fois pour chacun des couples. Chaque réplicat est considéré comme un échantillon indépendant. Les expériences menées avec de l'eau de mer de référence à 24 °C représentent la condition témoin. Les données sont représentées par des moyennes  $\pm$  l'écart-type. Dans le cas de données platykurtiques, les valeurs ont été transformées avec l'arc-sinus de la racine carrée avant les analyses statistiques (Legendre and Legendre 1998). La normalité de la distribution des données a été vérifiée sur les résidus des données de façon graphique. L'homogénéité des variances a ensuite été évaluée par le test de Levene ( $p < 0,05$ ). Dans le cas de variances homogènes et de normalité des données, une analyse Anova a été effectuée sur les données suivie d'un test post-hoc de Tukey. Dans le cas contraire, les données ont été analysées par le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (<http://cran.r-project.org/>).

En Europe, les milieux aquatiques sont continuellement soumis à divers contaminants d'origine domestique, industrielle et agricoles. Cette pollution de l'eau de mer constitue un risque pour la culture des espèces marines comme les bivalves. La détermination des concentrations ayant un impact toxique sur ces espèces est vitale pour la protection de ces ressources marines. Les résultats des bio-essais permettent ainsi de déterminer les seuils de toxicité potentielle des substances testées et susceptibles d'arriver dans le milieu marin.

Parmi les différents polluants qui peuvent contribuer à la pollution aquatique, les métaux lourds représentent l'une des formes les plus répandues et graves de contamination de l'environnement (Devi et al., 1996). Après l'interdiction du tributylétain dans les peintures anti-salissures, l'utilisation de produits à base de cuivre n'a cessé d'augmenter à travers le monde, augmentant les concentrations de ce métal dans les environnements aquatiques. Bien qu'essentiel, il est parmi les métaux les plus dangereux pour les larves de bivalves (Deslous-Paoli, 1981).

Quarante ans après la mise sur le marché du premier herbicide chloroacétamide disponible pour l'agriculture, cette classe de substances biologiquement actives représente encore l'un des produits agrochimiques les plus importants pour le contrôle des mauvaises herbes. Cependant parmi les différents polluants pouvant contribuer à la pollution des milieux aquatiques, la contamination en pesticide est maintenant reconnue. Le S-métolachlore est bien représenté dans les eaux du Bassin d'Arcachon de par son utilisation intensive en agriculture, notamment sur les cultures de maïs situé sur le bassin versant de la Leyre.

La contamination des écosystèmes aquatiques par des métaux lourds et pesticides a fait l'objet d'une attention croissante au cours des dernières décennies. C'est pourquoi, les deux composés (cuivre et S-métolachlore), majoritairement représentés dans les eaux du Bassin, ont été utilisés dans l'ensemble de cette étude en tant que polluants modèles du Bassin d'Arcachon et seront présents dans l'ensemble des chapitres qui suivent.



---

Chapitre 3 - ANALYSE DES EFFETS COMBINÉS DE LA  
SALINITÉ, DU CUIVRE ET DU S-MÉTOLACHLORE SUR LE  
DÉVELOPPEMENT EMBRYO-LARVAIRE DE L'HUÎTRE  
CREUSE JAPONAISE

---

*Chapitre 3. Analyse des effets combinés de la salinité, du cuivre et du S-métolachlore sur les capacités de reproduction et le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise*

Depuis l'avènement de l'ère industrielle, l'accroissement des activités humaines a conduit à une augmentation nette de la production de gaz à effet de serre. Celui-ci a entraîné une augmentation de la température de l'air mais aussi de l'eau, provoquant des modifications dans le cycle de l'eau.

Ceci se traduit à la fois par une évaporation plus forte dans les régions chaudes (équateur et tropiques) et des précipitations plus importantes aux hautes latitudes, diminuant dans ces régions la salinité des eaux océaniques. Le réchauffement entraîne également la fonte des glaces des calottes aux hautes latitudes. Ces deux phénomènes combinés conduisent à une augmentation des arrivées d'eau douce dans les eaux de surface océaniques.

C'est ainsi que des variations de la salinité des océans sont constatées, avec une augmentation de la salinité des eaux de surface dans les régions les plus exposées à l'évaporation tandis que les zones marines dans les latitudes élevées enregistrent une baisse de la salinité.

Par conséquent, le changement climatique devrait se traduire par une augmentation de la pluviométrie aux hautes latitudes, provoquant un apport d'eau douce dans l'Atlantique Nord pouvant diminuer la salinité.

Cette diminution de salinité est sans conteste l'un des facteurs de stress physique pouvant impacter les organismes marins. Ce facteur abiotique peut agir de façon synergique ou antagoniste avec le facteur de contamination du milieu. L'objectif de ce chapitre est donc d'étudier la capacité des embryons d'huître *Crassostrea gigas* à se développer normalement en larves D en présence de salinités décroissantes. Ces capacités seront étudiées de façon couplée ou non à différentes concentrations en cuivre ou en S-métolachlore, les deux polluants majoritairement retrouvés dans les eaux du Bassin.

En parallèle de cette étude, la faisabilité du test embryon larvaire en condition de salinité décroissante sera évaluée afin de définir les limites d'application de ce test.

## 1. Essai préliminaire

La préparation des eaux aux différentes salinités est basée sur la dilution de l’eau de mer avec la quantité adéquate d’eau ultra pure. La stabilité du pH a été mesurée et vérifiée avec un pH-mètre (Microprocessor pHMeter pH 537, Wissenschaftlich Technische Werkstätten) dans les eaux produites aux différentes salinités. Plusieurs dilutions ont été réalisées aux salinités de 23 à 33 u.s.i. Cependant aux salinités de 18 et 21 u.s.i, une seule dilution a été réalisée.

### Résultats

Il n’y a pas de différence significative de pH entre les salinités testées (Figure 39).

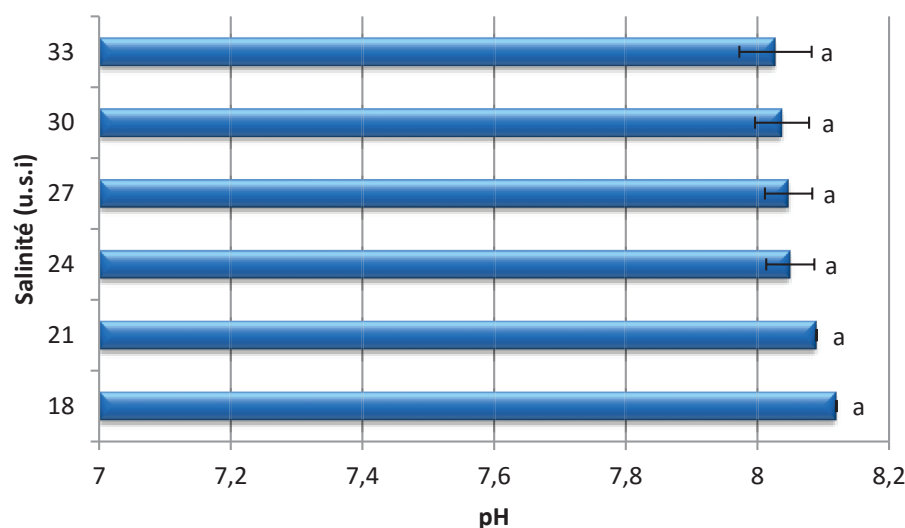


Figure 39 : Moyenne des mesures de pH ( $\pm$ écart type) pour chaque salinité de 18 à 33 u.s.i après dilution avec de l’eau ultra pure.

### Discussion

Ces essais préliminaires ont permis de mettre en évidence une absence de modification de pH dans les différentes solutions d’eau de mer. Ceci permet d’éliminer un facteur de variation supplémentaire qui peut avoir une influence sur la variabilité des pourcentages de malformations larvaires. En effet le pH du milieu peut jouer un rôle dans la calcification des bivalves. Des études antérieures ont montré que le succès de reproduction et les mécanismes biologiques impliqués dans la calcification peuvent être prématurément



interrompus ou perturbés lorsque les larves véligères de *Crassostrea gigas* sont exposées à un environnement acidifié. Ceci peut aussi réduire leur viabilité (Barros et al., 2013).

## **2. Article 1 : Effets combinés de la salinité et des polluants sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse *Crassostrea gigas* dans le Bassin d’Arcachon**

Dans cet article, les effets des salinités seules ou couplées aux polluants ont été évalués. Pour cela, différentes salinités couramment retrouvées dans les eaux du Bassin d’Arcachon en période de reproduction ont été testées (27, 30 et 33 u.s.i) ainsi que des salinités inférieures (18, 21 et 24 u.s.i). L’objectif de cet article est de déterminer quels pourraient être les impacts futurs des changements de salinité en lien avec le changement climatique sur la production de larves normales d’huître. Pour ce faire, des embryons d’huîtres en provenance de l’écloserie de Guernesey ont été exposés à différentes salinités, en présence ou non de différentes concentrations en cuivre (1,10 et 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) ou de métolachlore (10,100 et 1000  $\text{ng.L}^{-1}$ ). Les résultats obtenus confirment la robustesse du test embryon-larvaire en utilisant des embryons d’huître creuse *Crassostrea gigas* en provenance de l’écloserie de Guernesey. L’exposition des embryons d’huître au cuivre induit des effets embryon-toxiques dose dépendant avec une  $\text{CE}_{50-24\text{h}}$  de 7,35  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , démontrant l’extrême sensibilité des embryons d’huîtres d’écloserie à ce polluant. La concentration maximale de 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$  induit 100 % d’arrêt de segmentation larvaires. L’exposition aux différentes doses de S-métolachlore induit un fort pourcentage de malformations larvaires dès les concentrations environnementales, la LOEC étant définie à 0.01  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . La baisse de salinité entraîne des effets synergiques pour toutes les salinités étudiées en présence du cuivre, mais beaucoup plus important pour les deux dernières salinités testées (18 et 21 u.s.i). Pour des salinités < 33 u.s.i, une exacerbation de l’effet du S-métolachlore sur la capacité des embryons à se développer normalement en larves D a été constatée. Le test embryon larvaire sur l’huître est le plus souvent réalisé avec de l’eau de mer de référence à la salinité du milieu, c’est à dire variant autour de 33 u.s.i dans le cas du Bassin d’Arcachon. C’est pourquoi le second objectif de cette étude a été de déterminer les limites d’application du test embryon-larvaire à différentes salinités. Les résultats ont permis de mettre en évidence une limite de faisabilité du test pour des salinités  $\leq 24$  u.s.i en eau de mer filtrée.



## Combined effects of pollutants and salinity on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*



Perrine Gamain, Patrice Gonzalez, Jérôme Cachot, Patrick Pardon, Nathalie Tapie, Pierre Yves Gourves, Hélène Budzinski, Bénédicte Morin\*

Univ. Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 September 2015  
Received in revised form  
2 November 2015  
Accepted 4 November 2015  
Available online 10 November 2015

#### Keywords:

Copper  
Metolachlor  
Pacific oyster  
Embryotoxicity bioassay  
Salinity  
Multiple stresses

### ABSTRACT

For several years, low larval recruitment has been observed in Arcachon Bay, in southwest France. Exposure to pollutants could partly account for the reduction of early life stages of the Pacific oyster. This study evaluated the effects of copper and S-metolachlor in combination with salinity on the early life stages of *Crassostrea gigas*. Embryos were exposed to concentrations of copper (1, 10 and 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) or S-metolachlor (10, 100 and 1000  $\text{ng L}^{-1}$ ) and six salinities (18, 21, 24, 27, 30 and 33 u.s.i). Embryotoxicity was measured by considering both the percentage of abnormalities and arrested development in D-shaped larvae. Embryo-larval development was only affected at salinities  $\leq 24$  u.s.i, which have never been observed during *C. gigas* reproduction period in Arcachon Bay. Both contaminants had an effect at environmental concentrations. Our results suggest that copper and metolachlor toxicity was enhanced with decreasing salinity.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Aquatic environments are subjected to various types of chronic natural and anthropogenic stressors, such as global climate change and contamination (Adams, 2005). Numerous persistent pollutants of anthropogenic origin which enter the marine environment can ultimately be accumulated by filter feeders such as bivalves.

Bivalve species, including the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), have been shown as suitable bioindicators to study pollution in the aquatic environment (O'Connor, 2002). In fact, oysters are considered sentinel species and bioindicators of anthropized coastal ecosystems, due to their wide distribution, their sedentary lifestyle, and their sensitivity to a large range of pollutants (Conger et al., 1977; Geffard et al., 2002; His et al., 1999; Quiniou et al., 2007; Watermann et al., 2008; Wessel et al., 2007). *C. gigas* (oyster) accounts for a large proportion part of global aquaculture production, totaling an estimated 555 913 tons in 2013 (FAO, 2015). France is the world's 4th largest producer, with the Pacific oyster being the main produced species (FAO, 2015) with 101 100 tons in 2012 (CNC, 2012). The Arcachon bay represents for 6.92% (7000 tons) of French production in 2012 (CNC, 2012). But at present, it is

estimated that around 30% of the oysters sold in France are native to Arcachon Bay, a marine lagoon on France's Atlantic coast (Auby and Maurer, 2004). With more than 315 oyster farms, *C. gigas* is the main species cultivated in Arcachon Bay. However, for several years (2007–2012), low larval recruitment, reduced spat fall, and increased oyster mortality events have been observed. These could result from impaired reproduction, mortality or developmental defects at early life stages (Maurer et al., 2011; Samain and McCombie, 2007). Exposure to pollutants could partly account for the reduction in early life stages of the Pacific oyster. Among the several pollutants that can contribute to aquatic pollution, trace metals represent the most widespread forms of environmental contamination. Copper (Cu) is among the most hazardous metal for bivalve larvae (His et al., 1999). Although Cu is an essential micronutrient for living organisms (Festa and Thiele, 2011), it can be toxic above a certain concentration depending on the organism (Flemming and Trevors, 1989). All over the world, Cu is used as part of antifouling paint to prevent aquatic organisms from attaching themselves to the hulls of vessels (Turner, 2010). These paints consist of a complex mixture of four compounds: biocides, binders, solvents and adjuvants. Cu is commonly used as a fungicide in agriculture in particular for vineyard treatment. The Cu mean concentration along the French Atlantic coast has been studied by Geffard et al., 2002. Copper concentrations ranged from 70 to

\* Corresponding author.

158  $\mu\text{g g}^{-1}$  in sediments, 0.7  $\mu\text{g L}^{-1}$  in seawater (5–10.6  $\mu\text{g L}^{-1}$  in unfiltered elutriates and 0.4–1.1  $\mu\text{g L}^{-1}$  in filtered elutriates). The most recent data in the Arcachon bay show concentration of 0.8  $\mu\text{g L}^{-1}$  of copper (Mai et al., 2012). In oysters, copper bioaccumulation measurements were performed since 1983. Results show an increase from around 100  $\text{mg kg}^{-1}$  dry weight in 1983 to around 400  $\text{mg kg}^{-1}$  dry weight in 2015 (ROCCH, 2015). Pesticide contamination in Arcachon Bay is widely dominated by the metolachlor at around 10  $\text{ng L}^{-1}$  and its metabolites (Auby et al., 2007; Budzinski et al., 2011). In fact, Arcachon Bay is end recipient of several rivers draining a watershed of 4138  $\text{km}^2$  (Auby et al., 2014), which is mainly dominated by agriculture and urban areas. Metolachlor controls pre-emergent and early post-emergent broadleaf and grass weeds, and is regularly detected in surface water and groundwater. The processes controlling the contamination of surface and ground water are grouped into four major components: volatilization into the atmosphere of the products and their impact on soil by rain; adsorption/desorption on organic and inorganic compounds from soil; physico-chemical and biological degradation and transportation by water runoff and leaching (Van der Werf, 1996). Metolachlor is ranked as intermediate in terms of environmental mobility and persistency with a half-life degradation in soil of 6–10 weeks (Hostetler and Thurman, 2000). Metolachlor was initially introduced as a racemic product containing both R and S enantiomers in a same ratio. Prohibited in France since 2003, the racemic mixture is now being replaced worldwide by (S)-metolachlor. It has the same biological properties as racemic-metolachlor (O'Connell et al., 1998). The S-metolachlor, the active substance of several commercial formulations of pesticides, belongs to the family of chloroacetamides. Numerous physiological and biochemical toxic effects have been reviewed, including inhibition of lipid, protein and lignin synthesis, cell division, mineral uptake and increase of cell permeability (Couderechet et al., 1998). But the chloroacetamide functional group can also inhibit protein synthesis resulting in inhibition of normal development of organisms (Weisshaar and Böger, 1987; Weisshaar et al., 1988). Metolachlor ethane sulfonic acid (ESA) and metolachlor oxanilic acid (OA) are the two most common degradates of metolachlor. Arcachon Bay is facing growing anthropic pressures associated with demographic expansion, tourism and water sports, especially in summer (Le

Berre et al., 2010), which is also when oysters breed. In addition, global climate change might represent an additional stress to this highly vulnerable ecosystem. For instance, coastal waters are becoming less saline in some areas, due to cyclones and excess rainfall caused by climate change (Cao et al., 2011). Autecological studies of bivalves have clearly demonstrated that development, growth and survival are affected by physical parameters, in particular, temperature or salinity, which have been described as "master factors" for several marine organisms (Kinne, 1964; O'Connor and Lawler, 2004; Recksiek and Mcleave, 1971; Tuttlebach and Rhodes, 1981). The toxicity of some organic compounds was shown to increase as salinity increased, while the toxicity of others decreased as salinity dropped (Hall and Anderson, 1995). To our knowledge, few study have considered the future of D-larvae in brackish waters with lower salinities and the combined effect of pollutants and salinity on the early growth phase of oysters (MacInnes and Calabrese, 1979). The oyster life cycle consists of two different phases: (1) from fertilization until larval settlement, the species is pelagic, and only protected by a larval soft shell and (2) after settlement, individuals become benthic and develop a hard shell (Verween et al., 2007). However the toxicity of pollutants and the impact of environmental changes may vary during the different life stages of an organism (MacInnes and Calabrese, 1979). Previous studies have shown that early life stages of marine invertebrate organisms (embryos and larvae) are more sensitive to pollutants

than adult stages of the same species (Connor, 1972; Hrs-Brenko et al., 1977; Martin et al., 1981; Quiniou et al., 2007; Wisely and Blick, 1967). These early stages are then called critical stages and can be used for toxicity testing. One such test is the bioassay on *C. gigas* embryo-larval development, an acute and normalized aquatic ecotoxicity test which has been widely used to measure toxicity of single or mixed chemicals or environmental samples (AFNOR, 2009). To date, the species mainly used in bioassay is the Pacific oyster *C. gigas* (Barros et al., 2013; His et al., 1999; Mai et al., 2014, 2012; Mottier et al., 2014, 2013; Thomas-Guyon et al., 2009). In this test, developmental arrests are counted as larval abnormalities (His et al., 1999; AFNOR, 2009). However, developmental arrests represent embryos that have not reached the stage of D-larvae. It would therefore be useful to separate those arrests from abnormalities, since the consequences on larval survival and recruitment could be quite different. Previous studies have shown the embryotoxic effect on *C. gigas* D-larvae of copper and metolachlor at environmental concentration (Mai et al., 2012). The purpose of this work is (i) to test the effect of salinity range commonly encountered in Arcachon Bay during oyster breeding period on *C. gigas* early development and (ii) to evaluate the combined effect of commonly used pesticides and salinity on D-larvae of *C. gigas*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and seawater

Reference toxicants ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  and S-metolachlor) and formalin were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St. Quentin Fallavier, France). Seawater was collected in Arcachon Bay (SW France) near the Banc d'Arguin which is a location diluted by ocean contribution. This area has a naturally reproducing population of oysters. Immediately after sampling, seawater was filtered at 0.45  $\mu\text{m}$  and then 0.2  $\mu\text{m}$  (Xilab) to eliminate debris and microorganisms. Filtered seawater (FSW) was stocked at 4 °C in the dark and was used within 3 days. A few hours before experiment, FSW was filtered again at 0.2  $\mu\text{m}$ . This reference water was chemically analyzed for pollutant concentration determination.

### 2.2. Preparation of water salinity

Prior to each experiment, the salinity of the reference sea water was measured using a salinity probe (Wissenschaftlich Technische Werkstätten Multi 3401, sonde TetraCon 325). From this original salinity (33 u.s.i.) dilutions using ultra pure water were performed to obtain the final expected salinity of 18, 21, 24, 27, 30, and 33 u.s.i. These salinities were chosen according to those recorded from 2011 to 2013 (SOMLIT) in three points in Arcachon Bay. Salinity ranged from 25 to 33 in summer. Lower salinity of 18, 21 and 24 u.s.i was added to determine the salinity limits of the test.

### 2.3. Animals

Mature oysters (*C. gigas*, Thunberg, 1793) came from a commercial hatchery specialized in the year-round production of mature oysters (Guernsey Sea Farms, UK). Oysters were kept at around 10 °C for transportation and then acclimatized in FSW before the beginning of experiments. All oysters were used immediately.

### 2.4. Preparation of metal and pesticide solutions

The range of experimental concentrations was chosen on the basis of preliminary studies (Mai et al., 2014, 2012). The metal and pesticide solutions were made up from analytical grade copper

**Table 1**  
Limit of detection (LD) and limit of quantification (LQ) for metolachlor.

	10 ng L <sup>-1</sup>		100 ng L <sup>-1</sup>		1000 ng L <sup>-1</sup>	
	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ
Metolachlor	0.6	1.9	0.4	1.2	0.5	1.6

sulfate (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) and S-metolachlor. Working solutions were obtained diluting the stock solutions (100 mg L<sup>-1</sup> for copper and 250 mg L<sup>-1</sup> for S-metolachlor) in FSW and were chemically analyzed. Test solutions were then obtained by diluting the working solutions with FSW. Three concentrations of exposure were selected for copper: 1 (environmental concentration), 10 and 50 µg L<sup>-1</sup> and three for S-metolachlor: 10 (environmental concentration), 100 and 1000 ng L<sup>-1</sup>.

### 2.5. Trace metals and pesticides analysis

The working solutions were chemically analyzed to confirm pollutant concentrations. The analyses in wells in the absence of larvae were also performed for the highest and lowest concentrations at the end of the exposures to verify the variation in the tested concentrations during the period of the experiments. For chemical analysis of metals, three replicates of 10 mL each (stock solutions and FSW) were acidified with 5% final of nitric acid (Nitric acid 65%, Fluka). Samples were then analyzed by Inductively-Coupled Plasma Optic Emission Spectrometry (ICP-OES 720, Agilent Technologies, Arctachon, France). The validity of the method was periodically checked with Tort-2 and Dolt-4 certified materials (lobster hepatopancreas and dogfish liver from NRCC-CNRC, Ottawa, Canada) and values obtained were within the certified ranges. Quantification limit was 0.3 µg L<sup>-1</sup>.

Metolachlor levels were determined by liquid chromatography coupled with a triple quadrupole mass spectrometer and performed using a HPLC/MS/MS system from Agilent Technologies (HPLC 1290 system coupled to 6460 mass spectrometer) (mobile phase: water (5 mM ammonium acetate + 0.1% acetic acid)/methanol (100%/0%–0%/100% within 17 min at 0.5 mL/min); column: Kinetex C18 100 mm (length), 2.1 mm (internal diameter), 1.7 mm (porosity); ionization mode: ESI +). One mL of each individual solution was mixed with 50 µL of mixture of internal standards (metolachlor d6) in methanol (nominal concentrations 10, 100 or 1000 ng L<sup>-1</sup>) and were directly analyzed. Procedural blanks (three blanks between each sample) were performed to ensure the absence of laboratory-contamination. This also ensured optimal cleaning of the chromatographic system between samples, as well as making it possible to achieve the lowest possible detection limits while avoiding cross-contamination. Metolachlor was quantified using a quantification transition. Its presence was attested through a transition confirmation but also based on the relationship between abundance and the quantification of transition. Recovery and reproducibility were determined using spiked water samples (at nominal concentration of 10, 100 or 1000 ng L<sup>-1</sup>) processed at the same time as the samples to be characterized. Detection and quantification limits are reported in Table 1.

### 2.6. Embryotoxicity assay

Male and female oysters were induced to spawn by thermal stimulation, alternating immersion in FSW of 15 °C and 28 °C for 30 min. Spawning males and females were individually isolated in beakers with 0.2 µm FSW. They were left undisturbed for 15 min and were then removed from beakers. Eggs and sperm from two individuals were selected to give a single pairing. Sperms and eggs were sieved separately through 50 µm and 100 µm meshes respectively (Sefar Nitex), to eliminate debris and faeces. Sperm mobility was checked and the number of eggs was counted under the microscope (LEICA DME) at a magnification of 100. Eggs were fertilized with sperm using a ratio of 1:10 (egg:sperm) and homogenized with an agitator to prevent polyspermy. Fertilization success was verified under microscope, and embryos were then counted and transferred to 24-well microplates (Greiner Bio-One, polystyrene with TC surface treatment, Cellstar free of detectable DNase, RNase, human DNA and pyrogens) for embryotoxicity assays. The embryotoxicity assay has been described in detail by His et al. (1999) and AFNOR (2009), and more recently by Mai et al. (2012, 2014). Fertilized eggs (around 250 eggs) were exposed in wells containing 2 ml of toxicant solution. The eggs density was slightly changed compare to the recommended AFNOR document specifying densities between 20 000 and 50 000 embryos per liter. These microplates were incubated at 24 °C for 24 h in the dark. After incubation, 25 µl of 1% buffered formalin were added and the percentage of abnormal oyster larvae was recorded. One hundred individuals per well were directly observed under inverted microscope (Nikon eclipse TS100/TS100-F; TS100 LED MV/TS100 LED-F MV) to determine the number of abnormal D-shell larvae according to the criteria described in His et al. (1999) and AFNOR (2009) (Fig. 1). An important prerequisite for the test is the presence, in control conditions (24 °C in the absence of contamination) of less than 20% of larval abnormalities. Furthermore, the EC<sub>50</sub> value for CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O expressed as Cu<sup>2+</sup> should be between 6 and 16 µg L<sup>-1</sup>. In this experiment, four different couples were used and four replicates were performed for each conditions and for each couple.

### 2.7. Statistical analysis

All data is expressed as means ± standard deviation (S.D.). Data was first processed using the transformation  $p' = \arcsin \sqrt{p}$ .  $P$  corresponds to the raw data (frequency of abnormalities) specified in  $p$  values from 0 to 1 (Legendre and Legendre, 1998). Homogeneity of variance (Levene's test) was verified and statistical analysis was performed by the Kruskal–Wallis tests. Differences among data between conditions were then performed using Kruskal post hoc test (equivalent to the tuckeyHSD test for non-parametric data). Significance difference was accepted when  $p < 0.05$ . The EC<sub>50</sub> defined here as the toxicant concentrations causing 50% reduction in the embryonic development was calculated by PRISM 5 software (GraphPad software, California, USA). For the joint action toxicity of pollutants and salinity, the synergistic ratio (SR) model after Hewlett and Plackett (1969) was used.

$$SR = \frac{EC50 \text{ of a chemical acting alone at the reference salinity (33 u.s.i.)}}{EC50 \text{ of a chemical with different salinities}}$$

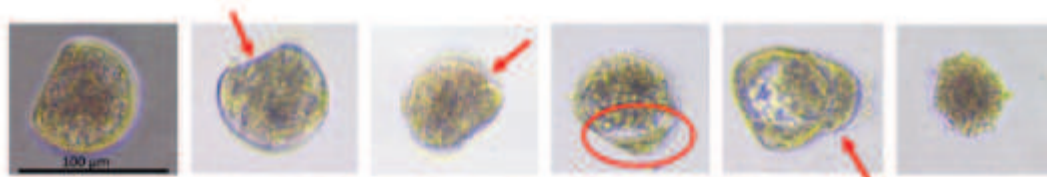


Fig. 1. The different abnormalities observed in *Crassostrea gigas* D-larvae.

Where  $SR = 1$  joint action is described as Additive,  $SR < 1$  joint action is described as Antagonistic and  $SR > 1$  joint action is described as Synergistic.

### 3. Results

#### 3.1. Chemical analysis of the tested pollutant solutions

##### 3.1.1. Copper

Analysis revealed the presence of copper in reference seawater at concentrations  $< 1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Table 2 shows Cu concentrations determined in the contamination solutions. For the  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  exposure condition, differences between nominal and measured concentrations can be encountered particularly at the salinity of 24 u.s.i. Other concentrations did not show important differences between nominal and measured concentrations and reached maxima of 21% variation range at  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  of Cu for salinity 30. Therefore, nominal concentrations were used to describe our results.

The measured concentrations at 24 h for the  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  exposure condition show for all salinities a decrease and the average concentration exhibits a 50% decrease. At nominal concentrations of  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ , a decrease of 32% was shown after 24 h exposure in wells.

##### 3.1.2. Metolachlor

Background metolachlor levels measured in reference seawater were less than  $3 \text{ ng L}^{-1}$  confirming the low contamination of reference seawater and that tests were done with good quality water (Table 3). For the  $10 \text{ ng L}^{-1}$  condition, a higher value was obtained with a variation range from 12 to 80% (Table 3). But concentrations achieved remained within ranges commonly encountered in the waters of the Bay. For the 100 and  $1000 \text{ ng L}^{-1}$  conditions, variations from 2 to 48% were observed in comparison to nominal concentrations.

At nominal concentrations of  $10 \text{ ng L}^{-1}$ , the measured concentrations at 24 h did not differ from those recorded at T0 whatever the salinity. At  $1000 \text{ ng L}^{-1}$ , we observed a slight decrease (about 16%) between 0 h and 24 h, but concentrations remained in the high range (Table 3). Consequently, it can be considered that organisms were exposed to constant concentrations of metolachlor

Table 2

Nominal and measured copper concentrations (mean values in  $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{SD}$ ) at the beginning of the embryotoxicity tests for each salinity and after 24 h exposure at  $24^\circ\text{C}$  in the absence of larvae. ND = not determined.

Nominal concentrations Salinity	Control		1		10		50	
	T0h	T24h	T0h	T24h	T0h	T24h	T0h	T24h
18	1.2	1.5	0.6	10.5	48.9	33.7		
21	0.7	ND	0.9	13.2	44.0	27.9		
24	0.4	4.4	0.9	9.0	51.1	34.4		
27	1.2	1.0	1.0	10.2	47.5	31.0		
30	0.9	1.3	0.5	7.9	43.3	28.9		
33	1.1	1.5	1.5	11.0	49.3	38.0		
Mean	0.9	1.9	0.9	10.3	47.4	32.3		
(SD)	0.3	1.4	0.3	1.8	3.1	3.8		

during the 24 h exposure.

#### 3.2. Effect of salinity on oyster embryonic development

For control conditions, no significant difference was observed between the highest four salinities tested (24, 27, 30 and 33 u.s.i) (Fig. 2). These salinities had less than 20% of larval abnormalities. However, significant differences were observed in control conditions for the lowest salinities tested (18 and 21 u.s.i) where the percentage of larval abnormalities were 47% and 30% respectively.

#### 3.3. Toxicity of copper in sea water at 33 u.s.i

24 h- $\text{EC}_{50}$  value expressed in  $\text{Cu}^{2+}$  concentration was calculated at 33 u.s.i. Copper inhibited the embryonic development of *C. gigas* with  $\text{EC}_{50}$  value of  $7.35 \mu\text{g L}^{-1}$ . Given the low percentage ( $6 \pm 3.6\%$ ) of larval abnormalities observed in control conditions at the salinity 33 u.s.i (Fig. 2) as well as an  $\text{EC}_{50}$  between 6 and  $16 \mu\text{g L}^{-1}$ , the embryo-larval test was validated according to the criteria given by AFNOR (His et al., 1997; AFNOR, 2009). Copper had a high effect on oyster embryo development, inducing a significant increase of the percentage of abnormal D-shell larvae ( $p < 0.05$ ). Embryotoxicity was observed from the lowest tested concentration at  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  of copper ( $p < 0.05$ ) and was concentration-dependent (Fig. 2). At  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  of copper, the percentage of abnormal D-larvae reached 54.4%. Results related to the types of abnormalities indicated that late developmental arrest was the predominant abnormality at  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  (100% of embryos).

#### 3.4. Effect of salinity on copper toxicity

Except at salinities of 18 and 21 u.s.i for which a negative impact of salinity was observed in embryo-larval development, the highest three salinities exhibit a similar pattern with no significant difference in larval abnormalities between salinities whatever the concentration of copper tested. 24 u.s.i is thus the lowest salinity at which the oyster embryo-larval could be used.

The analysis of dose–response data for the copper with different salinities from 33 to 18 u.s.i (Table 4) showed that the 24 h  $\text{EC}_{50}$

Table 3

Nominal and measured metolachlor concentrations (mean values in  $\text{ng L}^{-1} \pm \text{SD}$ ) at the beginning of the experiment for each salinity and after 24 h exposure at  $24^\circ\text{C}$  in the absence of larvae. ND = not determined.

Nominal concentrations Salinity	Control		10		100		1000	
	T0h	T24h	T0h	T24h	T0h	T24h	T0h	T24h
18	1.5	16.6	9.5	88.3	980.1	662.3		
21	1.3	11.2	12.5	87.6	636.9	635.2		
24	1.4	ND	ND	85.3	512.2	656.8		
27	2.3	18.0	19.0	88.9	921.6	617.7		
30	2.4	12.1	17.6	97.2	732.5	590.1		
33	2.8	12.1	14.0	99.3	808.9	683.7		
Mean	2.0	14.0	14.5	91.1	765.4	641.0		
(SD)	0.6	3.1	3.8	5.7	175.6	33.7		

## Chapitre 3 – Analyse des effets combinés de la salinité, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Japonaise

P. Gouzin et al. / Marine Environmental Research 113 (2016) 31–38

35

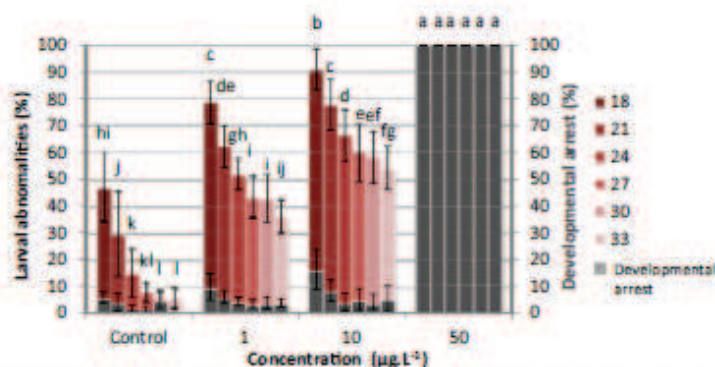


Fig. 2. Percentages (Mean  $\pm$  SD) of abnormal D-larvae following oyster embryo exposure to different concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  for various salinities. Values are mean  $\pm$  S.E. for four replicates. Different letters indicated significant differences between different concentrations or salinities ( $p < 0.05$ ).

Table 4

Analysis (based on synergistic model) of 24 h  $\text{EC}_{50}$  values with 95% confidence intervals (in parenthesis) of copper alone for reference salinity (33 u.s.i.) and copper with different salinities.

Salinity treatment	$\text{EC}_{50}$ (95CI) $\mu\text{g L}^{-1}$	SR
copper: 33 u.s.i.	7.4 (6.0–9.1)	—
copper: 30 u.s.i.	4.7 (3.7–5.9)	1.6
copper: 27 u.s.i.	5.8 (4.4–7.7)	1.3
copper: 24 u.s.i.	5.9 (5.4–6.4)	1.3
copper: 21 u.s.i.	4.3 (3.3–5.7)	1.7
copper: 18 u.s.i.	2.7 (2.0–3.8)	2.7

values were from 7.4 to 2.7  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectively. The effect of salinity on copper toxicity was observed for all tested salinities with synergistic ratios more than one (Table 4). This synergism is particularly pronounced for the lowest salinity (SR = 2.7).

### 3.5. Toxicity of metolachlor in seawater at 33 u.s.i.

Metolachlor had a significant effect on oyster embryo development, inducing an increase of the percentage of abnormal D-shell larvae ( $p < 0.05$ ). Embryotoxicity was observed from the lowest tested concentration at 10  $\text{ng L}^{-1}$  of metolachlor ( $p < 0.05$ ) with a four-times increase of abnormal larvae compared to control conditions (33.1  $\pm$  9.3%) (Fig. 3). A plateau effect was observed (around 50% of larval abnormalities) at 100 and 1000  $\text{ng L}^{-1}$  of metolachlor.

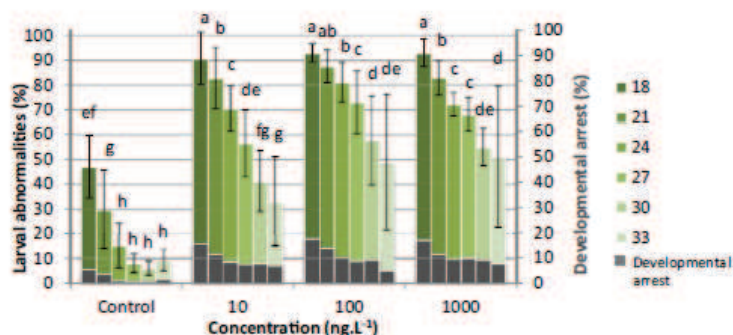


Fig. 3. Percentages (Mean  $\pm$  SD) of abnormal D-larvae following oyster embryo exposure to different concentrations of S-metolachlor for various salinities. Values are mean  $\pm$  S.E. for four replicates. Different letters indicated significant differences between different concentrations or salinities ( $p < 0.05$ ).

Finally, the percentage of developmental arrest was low compared to other abnormalities observed and was not concentration-dependent. It should be noted that at 33 u.s.i salinity, it was not possible to estimate a reliable  $\text{EC}_{50}$  value because the highest tested metolachlor concentration did not exceed the 50% effect.

### 3.6. Effect of salinity on metolachlor toxicity

Salinities 18 and 21 u.s.i cannot be used due to the impairment of oyster embryo development.

Similar responses were observed at 30 and 33 u.s.i salinities whatever the metolachlor concentration tested. However, lower salinities (24 and 27 u.s.i), combined with pollutant exposure, increase susceptibility of oyster embryos to embryotoxic effect of metolachlor compared to pollutant exposure alone. The lower the salinity, the higher the percentage of larval abnormalities.

## 4. Discussion

Chemical analysis was performed to compare nominal concentrations with the true concentrations in our experimental conditions and also to assess the potential changes in copper and metolachlor concentrations in the multi-well plates during the 24 h experimentation period. Metolachlor concentrations in seawater at the beginning of the experiment were in accordance with those expected and varied around 1–28% of the nominal concentration. In the absence of larvae, the measured concentrations did not

change during the bioassay whatever the salinity tested for the 10 ng L<sup>-1</sup> exposure. However, at the highest dose of 1000 ng L<sup>-1</sup>, analyses showed an average loss of 12% of metolachlor between the beginning and the end of the experiment. This result suggests that a small quantity of herbicide was either adsorbed by the container surfaces or volatilized. Copper concentrations for the two highest doses (10 and 50 µg L<sup>-1</sup>) fit well with expected nominal values. However, at the lowest nominal concentration (1 µg L<sup>-1</sup>), the measured concentration was higher than expected because it also included the metal concentration already present in the reference FSW. The differences observed between analysis performed for different salinities were most likely due to analytical variability or to variation in handling. The copper concentration monitoring in the 1 µg L<sup>-1</sup> condition at the beginning and at the end of the experiment showed a very good stability over 24 h. Approximately 20% loss were observed for the highest copper concentration after 24 h in the multi-well plates.

Data from this study showed that embryos of Pacific oyster are very sensitive to copper with a 24 h-EC<sub>50</sub> value of 7.35 µg L<sup>-1</sup> at 33 u.s.i. This value is in the low range according to the criteria given by AFNOR standard (i.e. EC<sub>50</sub> should be between 6 and 16 µg L<sup>-1</sup>). The EC<sub>50</sub> values of the same order of magnitude were obtained with *C. gigas* (Mai et al., 2012) and *Mytilus trossulus* (Nadella et al., 2009) embryos e.g. a 24 h-EC<sub>50</sub> of 12.5 µg L<sup>-1</sup> and 48 h-EC<sub>50</sub> of 6.9–9.6 µg L<sup>-1</sup> at the salinity 33 and 30 u.s.i respectively. His et al. obtained a higher 24 h-EC<sub>50</sub> at 37 µg L<sup>-1</sup> for *C. gigas* exposed to copper (His et al., 1999).

To date, only a handful of studies on the toxicity of metolachlor have been conducted on aquatic species (Cook and Moorea, 2008; Coquillé et al., 2015; Liu and Xiong, 2009; Mai et al., 2014, 2012; Neves et al., 2015; Thakkar et al., 2013). Data from this study confirm the high toxicity of metolachlor in *C. gigas* embryos. The same toxicity threshold (LOEC) at 0.01 µg L<sup>-1</sup> was obtained at the salinity 33 u.s.i from this study and previous works (Mai et al., 2012, 2014). The effect of metolachlor on oyster embryos was detected at lower concentrations than on other invertebrate species such as crayfish (80 µg L<sup>-1</sup>) (Cook and Moorea, 2008), aquatic midge (1000 µg L<sup>-1</sup>) (Jin-Clark et al., 2008) or crustaceans like *Daphnia magna* (0.5 mg L<sup>-1</sup>) (Liu et al., 2006). The S-metolachlor, the active substance of several commercial formulations of pesticides, belongs to the family of chloroacetamides. Numerous physiological and biochemical toxic effects have been reviewed, including inhibition of lipid, protein and lignin synthesis, cell division, mineral uptake and increase of cell permeability (Couderechet et al., 1998). But the chloroacetamide functional group can also inhibit protein synthesis resulting in inhibition of normal development of organisms (Weisshaar and Böger, 1987; Weisshaar et al., 1988).

These data confirm the sensitivity and strength of the Pacific oyster embryo-larval assay.

*C. gigas* is considered as an euryhaline species (His et al., 1989) since it can live at optimum salinities between 20 and 25, but can also survive at salinities above 35 and breed below 10 of salinity (FAO, 2015). Regarding our results, the salinity limit of the *C. gigas* embryo-larval test is around 24 for filtered sea water diluted with ultra pure water. This is in agreement with the results obtained by

His et al. (1997), who conducted an experiment with the same seawater dilution protocol as ours. At the salinity 25 u.s.i, they obtained less than 20% of larval abnormalities in D-larvae of *Crassostrea gigas*. In addition our data are supported by the norm (AFNOR, 2009) which specifies the test should be performed for *C. gigas* with salinities between 25 and 35.

Beyond the feasibility of the oyster embryo-larval assay, we can wonder about the impact of salinity on the successful development of *C. gigas* D-larvae in its natural environment. The salinity range allowing normal development of embryos to D-larvae is comprised

between 24 and 33 u.s.i. The responses of *C. gigas* embryos are comparable to those reported for *C. blecheri* between 24 and 30 u.s.i and for *Crassostrea rhizophorae* between 25 and 37 u.s.i (Dos santos and Nascimento, 1985; Tan and Wong, 1996). *Pinctada imbricata* (the pearl oyster) had little tolerance to low salinity < 29 u.s.i which affected the rate of development and the production of embryos (O'Connor and Lawler, 2004). Data obtained for several years by the French coastal ocean observation services (SOMLIT, 2015) revealed that salinity below 24 u.s.i does not occur during *C. gigas* breeding period in Arcachon Bay. This suggests that seasonal changes in salinity are unlikely to be a major problem for *C. gigas* embryo development in Arcachon Bay. Although being species reared in a wide range of salinity, as is the case for *C. gigas*, marine taxa have haline preferences. The survival and growth of the larvae may be affected when this parameter reach values lying within or beyond these values. That's why in France, recruitment of the oyster reaches important proportions in two French oyster bay: Arcachon and Marennes-Oléron. However, variations of salinity could be more important in another bay in France or in the world and could alter the development of D-larvae. In oysters natural habitat, salinity fluctuates with tidal cycles, rainfall and with drainage from adjacent terrestrial sites. Those physical stress can affect marine invertebrate defense mechanisms (Cheng and Combes, 1990). Haemocytes are resistant cells because only high values of salinity kill them (45 u.s.i) (Gagnaire et al., 2006). So other mechanism could be altered by decreasing salinity.

Considering the potential environmental risks of organic or inorganic contaminants, it is necessary to take into account the actual environmental conditions that can alter the toxicity of contaminants. In fact, the toxicity of a given pollutant can be influenced by numerous environmental factors including salinity (Warne, 2003). Pollutants can be adsorbed onto mineral or organic material, and their bioavailability can change significantly depending on environmental parameters (Ettajani and Amiard, 1995). The work reported here indicates that in the presence of copper, there is no or limited change of embryotoxicity to oysters above 24 u.s.i (with synergistic ratios 1.3 < SR < 1.5). Similar results were obtained for embryos of blue mussel *Mytilus trossulus* with no differential response in embryos exposed to a range of Cu concentrations (0.32 µg L<sup>-1</sup> – 100 µg L<sup>-1</sup>) at three salinities (20, 21.5 and 30.7 u.s.i) (Nadella et al., 2009). Madnnes and Calabrese (1979) reported that larval development of *Crassostrea virginica*, at all copper concentrations tested (5–90 µg L<sup>-1</sup>) was not significantly influenced by salinity (17.5–27.5 u.s.i). In contrast, in our study, low salinities 18 and 21 u.s.i enhanced copper toxicity.

Low salinities increase the sensitivity of oyster embryos to developmental effects of metolachlor. In control conditions, there is no significant difference from the salinity 24 to the salinity 33. However, at low salinity (24–27 u.s.i.), developmental defects in metolachlor-exposed larvae were greater than with higher salinity (30–33 u.s.i.). This salinity-dependent toxicity of metolachlor has not been documented to date. It can be hypothesized that salinity affects either the bioavailability of metolachlor or the general physiology of D-larvae, limiting the elimination or the degradation of metolachlor. The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump in cells of the gill

epithelium is involved in osmotic regulation and tolerance to salinity of aquatic organisms (Waring and Moore, 2004). However Waring et al. demonstrated that the herbicide atrazine decrease the activity of the enzyme Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in Atlantic salmon smolts (Waring and Moore, 2004). So it can hypothesize that metolachlor could affect the activity of this pump and increase the sensitivity of oyster embryos to salinity variations.

Arcachon Bay oysters are actually subjected to salinity between 25 and 33 u.s.i, which suggests that seasonal changes in salinity are unlikely to be a major problem in the presence of contaminants.

## Chapitre 3 – Analyse des effets combinés de la salinité, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse Japonaise

F. Gamain et al. / Marine Environmental Research 113 (2016) 31–38

3

However, with the climate change, possible changes in the frequency and/or intensity of extreme events, such as extreme precipitation, cyclones, and storm surges, could lead to occasional decreases in salinity in certain coastal zones (Eisenreich et al., 2005). There is therefore a risk that future effects of metolachlor may reduce the resistance of larvae to low salinity.

### 5. Conclusion

The present study confirms the high sensitivity of Pacific oyster embryos to trace metals and pesticides with a high strength of the results of the embryo larval assay. The study also shows that the pollutant concentrations that caused toxic effects on oyster embryos were in the concentration range currently measured in Arcachon Bay. These two pollutants could represent a major threat to reproduction of native or farmed oysters in the lagoon. At salinities commonly encountered in Arcachon Bay (25–35 during oyster breeding period), the effects of metolachlor are exacerbated. Another important result of this study is the feasibility limit of the embryo-larval test, which is in the region of 24 for filtered sea water.

### Acknowledgments

The authors thank the Aquitaine Region (OSQUAR Project), CPER A2E, Intermunicipal Union of Arcachon Bay (SIBA) and Water Agency Adour Garonne (AEAG) for their financial support. We gratefully acknowledge the staff of the SEPANSO for their help in obtaining reference seawater. This work was part of the LABEX COTE cluster of excellence "Continental To coastal Ecosystems; evolution, adaptability and governance". The authors would like to thank James Emery for providing English proofreading services.

### References

- Adams, S.M., 2005. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 649–657. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.11.040>.
- AFNOR XP T 90-382, 2009. Water quality – Bioindicator of potential toxicity in aqueous media – Determination of the potential toxicity of aqueous samples on bivalve embryo-larval development.
- Auby, I., Bocquene, G., Quiniou, E., Drenu, J.P., 2007. Etat de la contamination du Bassin d'Arcachon par les insecticides et les herbicides sur la période 2005–2006. *Impact Environ. Ifremer* 24, 108.
- Auby, I., Maurer, D., 2004. Etude de la reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon. *Ifremer* 327.
- Auby, I., Maurer, D., Passoni, S., Heroin, D., Rigouin, L., Météigner, C., Perrière-Rumié, M., Tournaire, M.-P., 2014. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon Année 2014. *Ifremer* 48.
- Barros, P., Sobral, P., Range, P., Chicharro, L., Matias, D., 2013. Effects of sea water acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 440, 200–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2012.12.014>.
- Budziński, H., Tapie, N., Magnan, A., Benyahia, M., 2011. Rapport ROPAR, pp. 1–23.
- Can, Z., Dai, M., Zheng, N., Wang, D., Li, Q., Zhai, W., Meng, E., Gan, J., 2011. Dynamics of the carbonate system in a large continental shelf system under the influence of both a river plume and coastal upwelling. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 116, T1–14. <http://dx.doi.org/10.1029/2010JG001596>.
- Cheng, T.C., Gomes, C., 1980. Influence of environmental factors on the invasion of molluscs by parasites: with special reference to Europe. *Biol. Invasions Eur. Mediterr. Basin* 307–332.
- CNC, 2012. La Production Française. URL: <http://www.cnc-france.com/La-Production-francaise.aspx>.
- Conger, K.A., Swift, M.L., Iii, J.B.R., Iakshmanan, S., 1972. Shell growth of unfed oysters in the laboratory: a sublethal bioassay system for pollutants. *Life Sci.* 22, 245–254.
- Connor, F.M., 1972. Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 3, 190–192.
- Cook, M.E., Moore, P.A., 2008. The effects of the herbicide metolachlor on agonistic behavior in the crayfish, *Procambarus rusticus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 94–102. <http://dx.doi.org/10.1007/s10244-007-9088-z>.
- Couderech, M., Schmalz, J., Boger, P., 1998. A specific and sensitive assay to quantify the herbicidal activity of chloroacetamides. *Pesticide Sci.* 52, 381–387.
- Coquillé, N., Jan, G., Moreira, A., Morin, S., 2015. Use of diatom motility features as endpoints of metolachlor toxicity. *Aquat. Toxicol.* 158, 202–210. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.021>.
- Dos santos, A.J., Nascimento, I.A., 1985. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* goulding, 1828. *Aquaculture* 47, 335–352.
- Eisenreich, S.J., JRC, I.I., Bernasconi, C., Campostrini, P., De Roo, A., George, G., Heiskanen, A.-S., Hjorth, J., Hoepfner, N., Jones, K.C., Noges, P., Pirrone, N., Rummals, N., Somma, E., Sölanakis, N., Umlauf, G., van de Bund, W., Viaroli, I., Vogt, J., M.Z. J., 2005. Climate Change and the European Water Dimension pp. 1–253.
- Etajani, H., Amiard, J.C., 1995. Biodisponibilité de quelques métaux fixés sur les matières en suspension (MES) en milieu estuarien. *Hydrobiologie Appliquée* 75–89. <http://dx.doi.org/10.1051/hydro:1995005>.
- FAO, 2015. Fisheries and Aquaculture Department. *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793). URL: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea\\_gigas/](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/).
- Festa, R.A., Thiele, D.J., 2011. Copper: an essential metal in biology. *Curr. Biol.* 21, R877–R883. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.09.040>.
- Fleming, C.A., Trevors, J.L., 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, Air, Soil Pollut.* 44, 143–158. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00228794>.
- Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immunol.* 20 (April), 536–547.
- Geffard, O., Budziński, H., His, E., 2002. The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis: larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. *Ecotoxicology* 11, 403–416. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1021024415695>.
- Hall, L.W., Anderson, R.D., 1996. The influence of salinity on the toxicity of various classes of chemicals to aquatic biota. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 281–346. <http://dx.doi.org/10.3109/10408449509021613>.
- Hewlett, P.S., Flackett, R.L., 1969. A unified theory for quantal responses to mixture of drugs: non-interactive action. *Biometrics* 15, 591–610.
- His, E., Beiras, R., Silhouette, C., 1987. Research Note: a simplification of the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Res.* 31, 351–355. [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00244-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00244-8).
- His, E., Heywang, I., Geffard, O., De Montaudouin, X., 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Res.* 33, 1706–1718. [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00281-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00281-9).
- His, E., Robert, R., Dinet, A., 1989. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 100, 455–463.
- Hostetler, K.A., Thurman, E.M., 2000. Determination of chloroacetamide herbicide metabolites in water using high-performance liquid chromatography-diode array detection and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Sci. Total Environ.* 248, 147–155.
- Hrs-ibenko, M., Claus, C., Bubic, S., 1977. Synergistic effects of lead, salinity and temperature on embryonic development of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biol.* 44, 109–115. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00386951>.
- Jin, Clark, Y., Anderson, T.D., Zhu, K.Y., 2008. Effect of alachlor and metolachlor on toxicity of chlorpyrifos and major detoxification enzymes in the aquatic midge *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 645–652. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-007-9067-4>.
- Kim, 1964. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. II. Salinity and temperature-salinity combinations. *Mar. Biol.* 1, 281–339.
- La Berre, S., Courtel, J., Brigand, L., 2010. Etude de la fréquentation nautique de Bassin d'Arcachon. Rapport final. Dir. régionale des Aff. Marit. Aquitaine – Ser. départementale Arcachon Géomér. Umr 6554 LETG – Univ. Bretagne Occiden 102.
- Legendre, P., Legendre, L.F.J., 1998. Developments in environmental Modelling. In Legendre, P., Legendre, L. (Eds.) *Numerical Ecology*, vol. 20, pp. 1–853.
- Liu, H., Xiong, M., 2008. Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metolachlor to *Chlorella pyrenoidosa*. *Aquat. Toxicol.* 93, 100–106. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.04.006>.
- Liu, H., Ye, W., Zhan, X., Liu, W., 2006. A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 451–455. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.02.002>.
- Madines, J.R., Calabrese, A., 1979. Combined effects of salinity, temperature, and copper on embryos and early larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 8, 553–562. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01055036>.
- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budziński, H., Morin, B., 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2663–2670. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.10.009>.
- Mai, H., Gonzalez, P., Pardon, P., Tapie, N., Budziński, H., Cachot, J., Morin, B., 2014. Comparative responses of sperm cells and embryos of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to exposure to metolachlor and its degradation products. *Aquat. Toxicol.* 147, 48–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.024>.
- Martin, M., Osborn, K.J., Billing, F., Gluckstein, N., 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Canar magister* larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 12, 305–308. [http://dx.doi.org/10.1016/0025-326X\(81\)90081-3](http://dx.doi.org/10.1016/0025-326X(81)90081-3).



### Chapitre 3 – Analyse des effets combinés de la salinité, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryonnaire-larvaire de l'huître creuse Japonaise

- Maurer, D., Auby, L., Moran, A., Barbier, C., Perrière-rumèbe, M., Tournaire, M.-P., Isabelle, A., Connes, C., 2011. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon – Année 2011. Ifremer (LER AR), p. 61.
- Motier, A., Kientz-Bouchart, V., Dulreale, C., Serpenti, A., Lebel, J.M., Costil, K., 2014. Effects of acute exposures to mecoprop, mecoprop-p and their biodegradation product (2-MCP) on the larval stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 146, 165–175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.008>.
- Motier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpenti, A., Lebel, J.M., Jha, A.N., Costil, K., 2013. Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 128–129, 67–78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.002>.
- Nadella, S.R., Fitzpatrick, J.L., Franklin, N., Bocking, C., Smith, S., Wood, C.M., 2009. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossulus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 340–348. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.09.001>.
- Neves, M., Castro, B.B., Vidal, T., Vieira, R., Marques, J.C., Coutinho, J.A.P., Gonçalves, E., Gonçalves, A.M.M., 2015. Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecol. Indic.* 53, 220–230. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.01.031>.
- O'Connell, P.J., Harms, C., Allen, J.R.F., 1998. Metolachlor, S-metolachlor and their role within sustainable weed-management. *Crop Prot.* 17, 207–212.
- O'Connor, T.P., 2002. National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. *Mar. Environ. Res.* 53, 117–143. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(01\)00116-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(01)00116-7).
- O'Connor, W.A., Lawler, N.F., 2004. Salinity and temperature tolerance of embryos and juveniles of the pearl oyster, *Pinctada imbricata* Röding. *Aquaculture* 229, 493–506. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00400-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00400-8).
- Quiniou, F., Damien, G., Gnassia-Barelli, M., Geoffard, A., Mouneyrac, C., Budzinski, H., Romeo, M., 2007. Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. *Env. Int.* 33, 27–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2006.06.020>, 0160-4120(06)00087-3.
- Redtsiek, C.W., Macleave, J., 1971. Distribution of pelagic fishes in the Sheepscot river-back river Estuary, Wiscasset, Maine. *Mar. Sci. Fac. Scholarsh.* 541–551.
- ROCCH, 2015. Les contaminants chimiques dans les huîtres et les moules du littoral français. URL: <http://envli.ifremer.fr/var/envli/storage/documents/parammaps/contaminants-chimiques/>.
- Samain, J.F., McCombie, H., 2007. Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In: Ifremer/Que (Ed.), *The Mores Project*, p. 400.
- SOMLIT, 2015. Service d'observation en milieu littoral. URL: <http://somlit.epoc.u-bordeaux1.fr/>.
- Tan, S., Wong, T., 1996. Effect of salinity on hatching, larval growth, survival and settling in the tropical oyster *Crassostrea belcheri* (Sowerby). *Aquaculture* 145.
- Lettlebach, S.T., Rhodes, E.W., 1981. Combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the Northern Bay scallop *Argopecten irradians irradians*. *Mar. Biol.* 63, 249–256.
- Thakkar, M., Randhawa, V., Wei, L., 2013. Comparative responses of two species of marine phytoplankton to metolachlor exposure. *Aquat. Toxicol.* 126, 198–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.10.002>.
- Thomas-Guyon, H., Gagnaire, B., Bado-Nilles, A., Bouilly, K., Lapègue, S., Renault, T., 2009. Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Dev. Comp. Immunol.* 33, 653–659. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2008.11.011>.
- Turner, A., 2010. Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 159–171. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.12.004>.
- Van der Werf, H.M.G., 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agric. Ecosyst. Environ.* 60, 81–96.
- Verween, A., Vincx, M., Degraer, S., 2007. The effect of temperature and salinity on the survival of *Mytilopsis leucophaeata* larvae (Mollusca: Bivalvia): the search for environmental limits. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 340, 111–120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2007.04.011>.
- Waring, C.P., Moore, A., 2004. The effect of abazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water and after sea water transfer. *Aquat. Toxicol.* 66, 93–104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.09.001>.
- Warne, M.S.J., 2003. A Review of the Ecotoxicity of Mixtures, Approaches to, and Recommendations for, their Management. *Environ. Prot. Herit. Courc.* 26.
- Watermann, B.T., Herlyn, M., Daehne, B., Bergmann, S., Meemken, M., Kolodziej, H., 2008. Pathology and mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in 2005 at the East Frisian coast, Germany. *J. Fish Dis.* 31, 621–630. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.00953.x>.
- Weisshaar, H., Böger, P., 1987. Primary effects of chloroacetamides. *Pesticide Biochem. Physiol.* 28, 286–293.
- Weisshaar, H., Retzlaff, G., Böger, P., 1988. Chloroacetamide inhibition of fatty acid synthesis. *Pesticide Biochem. Physiol.* 32, 212–216.
- Wessel, N., Rousseau, S., Gaisay, X., Quiniou, F., Akcha, F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[alpha]pyrene, 17 alpha-ethynylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.* 85, 133–142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.08.007>.
- Wisely, B., Blick, R., 1967. Mortality of marine invertebrate larvae in mercury, copper, and zinc solutions. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 18 (1), 63–72.

La toxicité des polluants pouvant être modifiée aux différentes salinités, la question se pose de savoir si d'autres facteurs abiotiques peuvent également avoir un impact. Un écosystème est en effet composé d'un ensemble de facteurs, qu'ils soient biotiques ou abiotiques, pouvant interagir entre eux. Parmi ces différents facteurs, la température a été sélectionnée comme paramètre d'étude. Avec la salinité, elle représente l'un des facteurs clés pour de nombreux organismes marins, en affectant leur développement, leur croissance et leur survie. Dans un contexte de changement climatique, l'accroissement des températures, couplé ou non à la présence des polluants est susceptible d'altérer le développement des embryons et des larves d'huîtres. Les résultats sont présentés dans le prochain chapitre.



---

Chapitre 4 - EFFETS COMBINÉS DES CHANGEMENTS DE  
TEMPÉRATURE, DU CUIVRE ET DU S-MÉTOLACHLORE  
SUR LE DÉVELOPPEMENT EMBRYO-LARVAIRE DE  
L'HUÎTRE CREUSE JAPONAISE

---

*Chapitre 4. Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryo-larvaire de l’huître creuse Japonaise*

Au cours du 20<sup>e</sup> siècle, une nette augmentation des niveaux marins a été démontrée avec une augmentation moyenne de 3 cm de 1993 à 2003. Cette montée du niveau moyen est attribuée au réchauffement qui touche la planète. Le phénomène de réchauffement climatique concerne l'atmosphère, mais également la température des mers et des océans : leur température augmente au même titre que la température atmosphérique.

Les organismes marins sont ainsi soumis à des conditions environnementales fluctuantes, s'éloignant de leurs conditions de vie optimale et pouvant influencer la toxicité des polluants. La température joue un rôle clé parmi ces facteurs environnementaux de par son impact direct sur tous les processus physiologiques.

Dans ce chapitre, le test embryo-larvaire a été réalisé à différentes températures d'incubation de 20 °C à 30 °C en présence de différentes concentrations en cuivre ou en S-métolachlore, avec des huîtres provenant d'écloserie ou de différents sites du Bassin d'Arcachon. Le premier objectif est d'étudier le développement des deux types d'embryons aux différentes températures, puis d'étudier l'effet des températures couplées aux contaminants. Enfin le dernier objectif est de valider ou non l'utilisation des huîtres d'écloserie comme alternative aux huîtres Bassin d'Arcachon pour étudier l'impact des polluants et d'autres facteurs de stress.

## 1. Essai préliminaire

### Introduction

Des expériences préliminaires sur le test embryo-larvaire ont été réalisées afin de valider la méthodologie employée. La saturation en oxygène a été suivie dans les puits des microplaques en absence ou en présence de larves afin de s’assurer des niveaux d’oxygénation au cours du test embryo-larvaire, quelles que soient les températures d’incubation appliquées (Expérience A). Deux méthodes d’incubation ont également été expérimentées à une température élevée (Expérience B).

### Expérience A

#### Matériel et méthodes

Au cours de l’expérience A, l’oxygénation dans les micropuits a été mesurée à l’aide d’une sonde à oxygène (Fibox 3, Fiber optic oxygen transmitter, Precision Sensing) en début et en fin d’expérience à six températures d’incubation : 20, 22, 24, 26 ,28 et 30 °C. Nous avons disposé, selon le protocole habituel, des microplaques dans les étuves pré-réglées à la température désirée. Les mesures ont été menées en condition témoin dans des microplaques de 24 puits contenant chacun 2mL d’eau de mer de référence en présence ou en absence de larves D pour chacune des températures sélectionnées. Les mesures ont également été réalisées à la température idéale de développement de 24 °C en présence de différentes concentrations en cuivre (1, 10 et 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) ou de S-métolachlore (10, 100 et 1000  $\text{ng.L}^{-1}$ ).

#### Résultats

Le pourcentage de saturation en oxygène reste relativement constant au cours du temps quelle que soit la température d’incubation, la présence ou l’absence de larves, la présence ou non de contaminants. Le pourcentage de saturation en oxygène dans les puits de la microplaque reste toujours compris entre 95 % et 100% (Figure 40 et 41).

Chapitre 4 – Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryolaire de l'huître creuse Japonaise

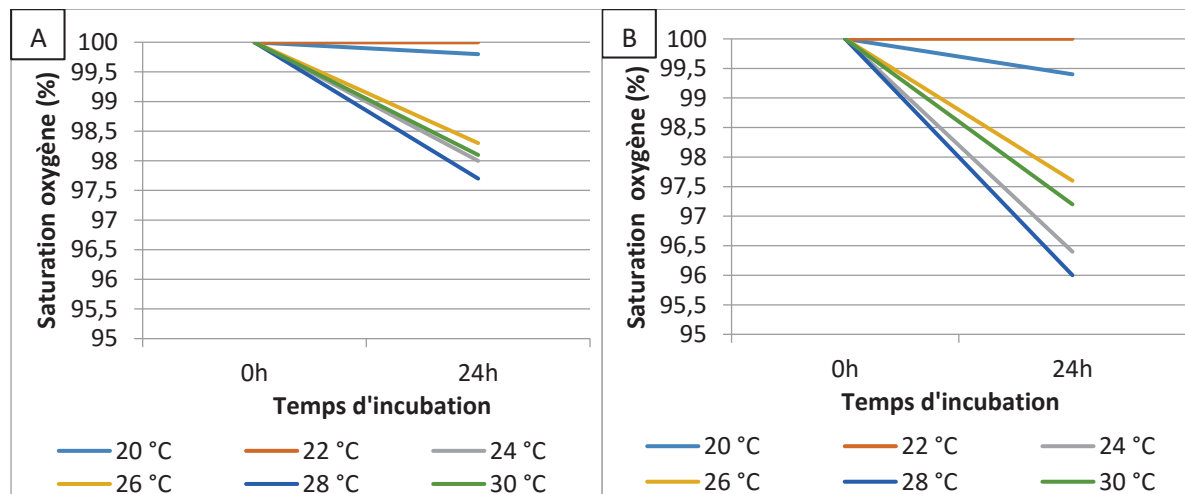


Figure 40 : Pourcentage de saturation en oxygène dans les micropuits avant incubation (T0h) et à la fin de l'incubation (T24h) à différentes températures (20, 22, 24, 26, 28, 30 °C) en absence (A) ou en présence (B) de larves

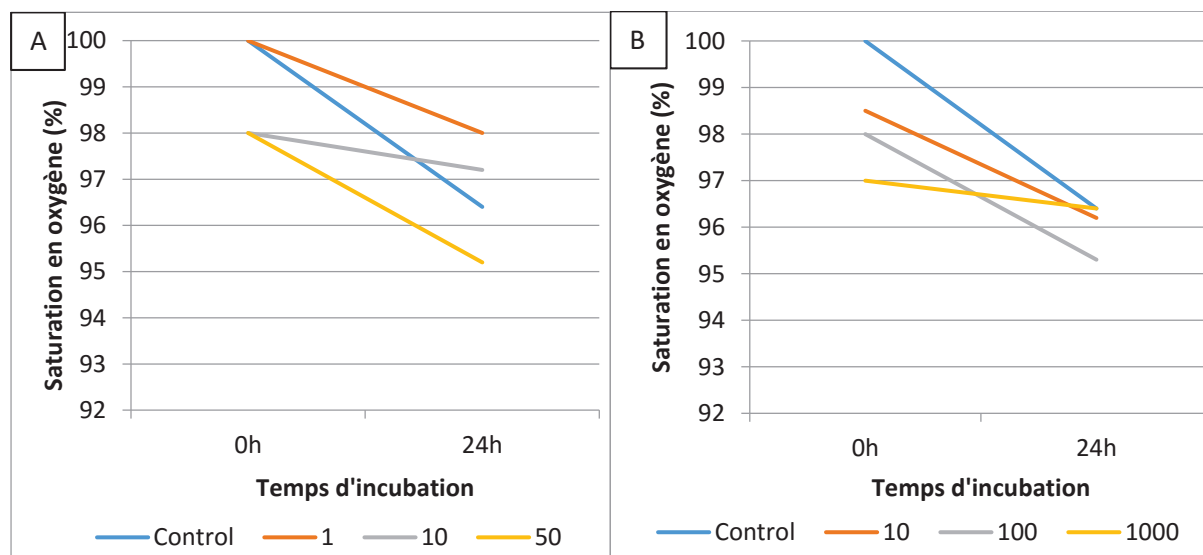


Figure 41 : Pourcentage de saturation en oxygène dans les micropuits avant incubation (T0h) et à la fin de l'incubation (T24h) à 24 °C en présence de larves contaminées au cuivre (A) ou au métolachlore (B).

**Expérience B****Matériel et méthodes**

Afin de s’assurer de l’incubation des embryons aux températures désirées et donc de l’absence de biais expérimental dans le protocole de manipulation, deux essais ont été menés en parallèle à la température de 30 °C :

**Essai A :** Au cours de cet essai, les microplaques contenant les différentes conditions d’études ont été mises à incuber à 30°C avant l’inoculation des embryons afin d’amener l’eau à la température souhaitée. Une fois la température ciblée obtenue, les embryons ont été introduits dans les puits puis exposés 24h à 30 °C.

**Essai B :** Les embryons ont été introduits dans les microplaques contenant les différentes conditions d’études à la température ambiante, puis exposés 24h à 30 °C.

Cette expérience a été menée sur 3 couples différents : C1, C2 ou C3 en condition témoin mais aussi en présence de 2 µg.L<sup>-1</sup> de cuivre.

**Résultats**

En absence de contamination ou en présence de cuivre, il n’y a pas de différence significative entre les deux essais (Figure 42). Des pourcentages de malformations larvaires similaires ont été obtenus pour chacun des couples étudiés, démontrant la reproductibilité des résultats.

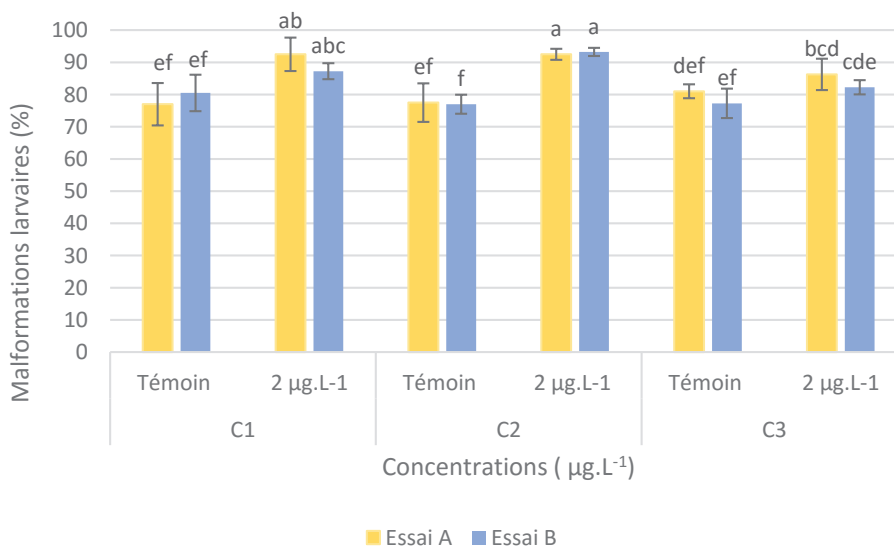


Figure 42 : Pourcentage de malformations larvaires en l’absence de contamination ou en présence de 2 µg.L<sup>-1</sup> de cuivre selon deux méthodes d’incubation A (Puits à 30 °C avant inoculation, inoculation puis incubation 24H à 30 °C) ou B (puits à température ambiante (24°C avant inoculation, inoculation puis incubation 24H à 30°C)



### **Discussion et conclusion**

Le pourcentage de saturation en oxygène compris entre 95 % et 100 % est resté élevé tout au long des 24H d'expérience et représente un très bon pourcentage d'oxygénation. En effet, selon les recommandations pour la réalisation du test embryon-larvaire (Leverett and Thain, 2013), la concentration d'oxygène dissous doit être supérieure à 60 %. Dans nos conditions d'application, aucune aération des puits n'est nécessaire au cours de l'expérience, le pourcentage de saturation étant adéquat à la bonne réalisation du test. Le taux d'oxygène en fin d'expérience ne montrant pas de différence significative par rapport à T0h, nous pouvons admettre que les effets embryotoxiques observés au cours de nos différentes expériences ne proviennent pas d'une diminution de la saturation en oxygène. En effet, le pourcentage reste largement supérieur à 60 % après les 24 heures d'incubation quelle que soit la température d'incubation. De plus la méthodologie employée pour amener l'eau des puits à la température d'exposition n'influence pas significativement le développement des larves. L'expérience ayant été menée à la température la plus élevée, et donc la plus longue à atteindre, nous pouvons conclure que l'une ou l'autre méthode d'incubation peut être utilisée.

## 2. **Article 2 : Effet combinés des températures et des polluants sur le développement embryo-larvaire de l’huître creuse *Crassostrea gigas*.**

Les expériences préliminaires ont permis de s’assurer de la méthodologie employée pour tester différentes températures d’incubation au cours du test embryo-larvaire. Différentes températures couramment retrouvées dans les eaux du Bassin en période de reproduction (20, 22, 24 °C) ont été testées sur le développement embryo-larvaire de l’huître. Des températures supérieures de 26, 28 et 30 °C ont également été sélectionnées afin de déterminer l’impact que pourrait avoir l’augmentation des températures des eaux de surface en lien avec le changement climatique et les répercussions futures pour la filière ostréicole. Pour cela, des huîtres sauvages et cultivées natives du Bassin d’Arcachon ont été prélevées au cours de l’été 2014 à différentes dates et en différents points : Les Jacquets et Compran, deux sites situés sur des chenaux différents du Bassin et présentant des masses d’eau différentes. L’objectif de cette étude est de déterminer si des différences dans le développement embryo-larvaire des huîtres peuvent survenir en fonction de l’origine des géniteurs ainsi que du mode de culture des géniteurs (sauvages ou cultivés). Dans cette optique, des embryons d’huîtres de différentes origines et modes de cultures ont été exposés aux températures sélectionnées en présence ou non de différentes concentrations en cuivre (1,10 et 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) ou en S-métolachlore (10, 100 ou 1000  $\text{ng.L}^{-1}$ ). Les résultats ont permis de déterminer qu’en absence de contamination, seules des températures comprises entre 22 °C et 26 °C permettent un développement normal des larves D. Un mode d’action synergique des effets des polluants en présence de faible / haute température a été observé. Les huîtres autochtones du Bassin sont sensibles à une augmentation de la température, ce qui suggère une future augmentation du pourcentage d’anomalies larvaires avec le changement climatique mondial. Parallèlement à cette étude, les résultats obtenus pour les huîtres natives du bassin d’Arcachon ont été comparés aux résultats acquis avec des géniteurs en provenance de d’écloserie. L’objectif de cette deuxième partie est de déterminer si les huîtres d’écloserie représentent un bon modèle pour l’étude de l’effet des températures couplées ou non aux polluants par rapport aux huîtres natives du bassin d’Arcachon. Finalement les huîtres d’écloserie semblent répondre de la même manière (effet synergique) à l’action des faibles / hautes températures couplées aux polluants Ce modèle représente une bonne alternative pour étudier les effets des polluants et des températures.

## Influence of the combined effects of temperature and pollutants on embryonal larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

Perrine Gamain<sup>1</sup>, Patrice Gonzalez<sup>1</sup>, Jérôme Cachot<sup>1</sup>, Christelle Clérendeau<sup>1</sup>, Hélène Budzinski<sup>1</sup>, Nicolas Mazzella<sup>2</sup>, Pierre Yves Gourves<sup>1</sup>, Bénédicte Morin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univ. Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

<sup>2</sup> IRSTEA, URRBEX (Water research Unit), 50 avenue de Verdun, Gazinet, 33612 Cestas Cedex France

### ABSTRACT

This study evaluates the combined effects of two contaminants (copper and S-metolachlor) and temperature on the early life stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* native from the Arcachon Bay (SW, France). The responses of D-larvae, obtained from wild and cultivated oysters, were investigated for one year during oyster breeding period at different sampling sites and compared with the response of D-larvae from a commercial hatchery. Embryos were exposed to three concentrations of copper: 1, 10 and 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ; or three concentrations of S-metolachlor: 10, 100 and 1000  $\text{ng.L}^{-1}$  and six temperatures: 20, 22, 24, 26, 28 and 30 °C. Embryotoxicity was measured by considering the percentage of abnormal D-shaped larvae. Normal development of embryos occurred only from 22 °C to 26 °C. There is a synergistic mode of action of the effects of pollutant in the presence of low/high temperature. Native oysters appear sensitive to an increase of temperature, suggesting a future increase of the percentage of larval abnormalities with global climate change. With rising temperature, in the context of sustainability of oyster farming, increased of oyster crisis is expected. Oysters from hatchery appear to respond in a same way to the effect of low/high temperature in combination with pollutant although with a higher sensitivity. It represents a good alternative model for studying the effect of pollutant as well as climate change stressors.

**Key words:** Pacific oyster, pollutants, temperature, embryotoxicity, climate change

## Introduction

Marine ecosystems are typically subjected to a variety of stressors, both natural and anthropogenic, including pollutants and climate change (Adams, 2005). The various stressors do not always act independently. In some cases the effects can be additive, or even amplified (Doney et al., 2012). This phenomenon could impact some marine species and represents a threat for cultivated species. Oysters are ecologically and economically important cultivated species through the world. The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is known because of its ability to adapt to a wide range of environmental conditions. This species was confined, at the beginning of its introduction, to the south of the French Atlantic coast and now became established at more northern latitudes (Cognie et al., 2006). Moreover, in the initial introduction zones, the occurrence of significant mass mortalities in both adult and juvenile *C. gigas* populations has been notified (Cotter et al., 2010b; Mori, 1979; Perdue et al., 1981; Pernet et al., 2011; Watermann et al., 2008). In the Arcachon Bay, since 1998, several years have been particularly unfavorable for oyster larval recruitment and high mortality of oyster spat has been recorded. This organism has a complex life cycle in which metamorphosis is a crucial step. The different processes involved in metamorphosis of embryos into D-larvae could be in close relationship with climate factor (Ko et al., 2014). Warming of the seawater is known to be an important physical stressors for marine species (Kinne, 1964; Kroeker et al., 2013; Lannig et al., 2006; O’Connor and Lawler, 2004a). Such findings are a concern because over the last century, there has been a 0.74 °C rise in surface ocean temperatures (Hoegh-Guldberg et al., 2007) and by 2100, it is anticipated that surface global temperatures will rise a further 1- 4 °C (IPCC, 2013) by the end of the century. However, the early life stage of development are more susceptible to change in their environment than adult stages because they are developing their physiological capacities (Pörtner et al., 1998). Moreover, early life stage of marine organisms have been recognized as potentially vulnerable to stressors associated with climate change (Przeslawski et al., 2015). In the Arcachon Bay, water temperatures range from 20 °C to 24 °C during oyster breeding period (SOMLIT, 2015) However, coastal ecosystems, such as the Arcachon Bay, are subjected to human activities which may produce serious disturbances. These ecosystems are under constant increasing anthropic pressure, such as pollution, and these disturbances threatened natural communities such as oysters. In the Arcachon Bay, recent reports evidenced the occurrence in water of several organic compounds like pesticides, but also metals. Among them, copper (Cu) and S-metolachlor are mainly found in waters. Indeed, S-metolachlor was recovered at concentration around 10 ng.L<sup>-1</sup> (Auby et al., 2007; Budzinski et al., 2011), while Cu mean concentrations in seawater of the Arcachon Bay was 1.1 µg.L<sup>-1</sup> (Gamain et al., 2016d). Although many studies have investigated the putative interactive effects between temperature and salinity variations or ocean acidification on oysters (Doroudi et al., 1999; Dos santos and Nascimento, 1985; His et al., 1989a; Ko et al., 2014;

O’Connor and Lawler, 2004a; Parker et al., 2010) only a few studies have evaluated the effect of temperature on pollutant toxicity (Lannig et al., 2006; MacInnes and Calabrese, 1979) on early life stage of oysters. The aim of this work was to study the interactive effects of temperature, copper and S-metolachlor on D-larvae development of the Pacific oyster *C. gigas* to provide a better understanding of how climate change will impact aquatic ecosystem processes. The response of D-larvae from a commercial hatchery and D-larvae issued from adult oysters from the Arcachon Bay has been compared. Moreover, inside the lagoon, the response of D-larvae from wild and cultivated oysters has been studied.

## 1. Materials and methods

### 1.1 Brood stock

Mature oysters (*C. gigas*, Thunberg, 1793) came from a commercial hatchery specialized in the production of mature oysters’ year round (Guernsey Sea Farms, UK). Oysters were kept at around 10 °C for transportation and then acclimatized in filtered seawater (FSW) before the beginning of experiments. All oysters were used immediately. In summer, wild and cultivated oysters were collected during oyster breeding period from two different sites in the Arcachon Bay: Comprian and Les Jacquets (Fig. 1). Comprian is located close to fluvial inputs and under influence of tributaries in contrast to Les Jacquets. Animals were brought back to the laboratory in tanks filled with seawater site and were kept overnight in this water aerated by an air bubbling at a regulated temperature of 12 ° C.

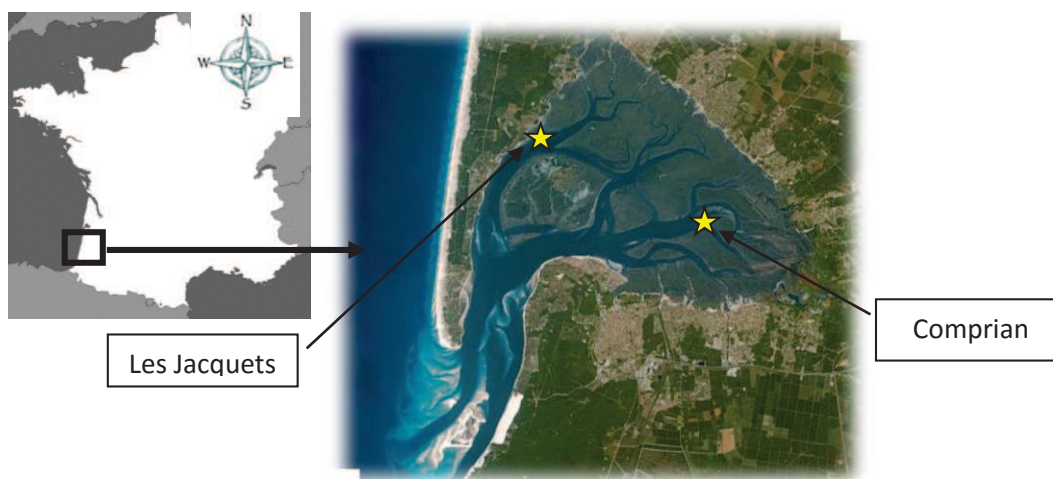


Figure 1: Sampling site for mature oysters (stars) in the Arcachon Bay (SW France)

## 1.2 Heavy metals and pesticides

Reference toxicants ( $\text{CuSO}_4$  and S-metolachlor) and formalin were purchased from Sigma–Aldrich Chemical (St. Quentin Fallavier, France). Seawater was collected in the Arcachon Bay (SW France) near the Banc d'Arguin which is a location diluted by ocean contribution. Immediately after sampling, seawater was filtered using membrane filter of  $0.45\ \mu\text{m}$  and then  $0.2\ \mu\text{m}$  (Xilab) to eliminate debris and microorganisms. FSW was stocked at  $4\ ^\circ\text{C}$  in the dark and was used within 3 days. A few hours before experiment, FSW was filtered again at  $0.2\ \mu\text{m}$ . This reference water was chemically analyzed for pollutant concentration determination.

The range of experimental concentrations was chosen on the basis of preliminary studies (Mai et al., 2014, 2012). The metal and pesticide solutions were made up from analytical grade copper sulfate ( $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ ) and S-metolachlor. Working solutions were obtained diluting the stock solutions ( $100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for copper and  $250\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for S-metolachlor) in FSW and were chemically analyzed. Three concentrations of exposure were selected for copper:  $1$ ,  $10$  and  $50\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and for -S-metolachlor:  $10$ ,  $100$  and  $1000\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .

The working solutions were chemically analyzed to confirm pollutant concentrations. For chemical analysis of copper at  $1$  and  $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , each seawater sample was acidified with 5% final of nitric acid (Nitric acid 65%, Fluka). Samples were then analyzed by Inductively-Coupled Plasma Optic Emission Spectrometry (ICP-OES, Vista Pro, Agilent Technologies) and by Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS, Xseries2, Thermofisher Scientific). The standards solutions were prepared from a multielementary calibration solution (Astasol-Mix M010, Analytika, Czech Republic), in a seawater certified solution (NASS-6 from NRCC-CNRC, Ottawa, Canada). The samples were diluted in a 3% final nitric acid solution (made from a nitric acid 65% FisherScientific Trace Metal Grade solution) 1:2 (v/v) for ICP-OES analysis and 1:3 (v/v) for ICP-MS analysis. Quantification limit were  $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (ICP-OES) and  $0.3\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (ICP-MS).

For chemical analysis of copper at  $50\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , three replicats of  $10\ \text{mL}$  each (stock solutions and FSW) were acidified with 5% final of nitric acid (Nitric acid 65%, Fluka). Samples were then analysed by Inductively-Coupled Plasma Optic Emission Spectrometry (ICP-OES 720, Agilent Technologies, Arcachon, France). The validity of the method was periodically checked with Tort-2 and Dolt-4 certified materials (lobster hepatopancreas and dogfish liver from NRCC-CNRC, Ottawa, Canada) and values obtained were within the certified ranges. Quantification limit was  $0.3\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Metolachlor level was determined by liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass spectrometer and performed using a HPLC/MS/MS system from Agilent Technologies company (HPLC 1290 system coupled to 6460 mass spectrometer) (mobile phase: water (5 mM ammonium acetate + 0.1% acetic acid)/methanol (100%/0% to 0%/100% within 17 min at 0.5 mL/ min); column: Kinetex C18 100 mm (length), 2.1 mm (internal diameter), 1.7 mm (porosity) ; ionization mode: ESI +). One mL of each individual solution was mixed with 50  $\mu$ L of mixture of internal standards (metolachlor d6) in methanol (nominal concentrations 10, 100 or 1000 ng.L<sup>-1</sup>) and were directly analyzed. Procedural blanks (three blanks between each sample) were performed to ensure the absence of laboratory-contamination. Moreover, it ensures optimal cleaning of the chromatographic system between each sample and allows to achieve detection limits as low as possible while avoiding cross-contamination. Metolachlor was quantified using a quantification transition. Its presence is attested through a transition confirmation but also thanks to the relationship between abundance and the quantification of transition. Recovery and reproducibility were determined using spiked water samples (at nominal concentration of 10, 100 or 1000 ng.L<sup>-1</sup>) processed at the same time as the samples to be characterized. Detection and quantification limits are represented in table 1.

Table 1: Limit of detection (LD) and limit of quantification (LQ) for metolachlor

	10 ng.L <sup>-1</sup>		100 ng.L <sup>-1</sup>		1000 ng.L <sup>-1</sup>	
	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ
<b>Metolachlor</b>	0,6	1,9	0,4	1,2	0,5	1,6

### 1.3 Embryotoxicity assay

For oysters from the commercial hatchery, male and female were induced to spawn by thermal stimulation, alternating immersion in FSW of 15 °C and 28 °C for 30 min. Spawning males and females were individually isolated in beakers with 0.2  $\mu$ m FSW. They were left undisturbed for 15 min and were then removed from beakers. Eggs and sperm from two individuals were selected to give a single pairing. Sperms and eggs were sieved separately through a 50  $\mu$ m and 100  $\mu$ m meshes (Sefar Nitex), respectively to eliminate debris and feces. Sperm mobility was checked and the number of eggs was counted under microscope (LEICA DME) at a magnification of 100. Eggs were fertilized with sperm in ratio of 1:10 (egg:sperm) homogenizing with an agitator to prevent polyspermy. Fertilization success was verified under microscope, and embryos were then counted and transferred to 24-well microplate (Greiner Bio-One, Cellstar free of detectable DNase, RNase, human DNA and pyrogens) for embryotoxicity assays. The embryotoxicity assay has been described in details by His et al. (1999) and Quiniou et al. (2005) and normalized (AFNOR, 2009). Fertilized eggs (around 500 eggs) were exposed

in wells containing 2 ml of toxicant solution. The eggs density was slightly changed compare to the recommended AFNOR document specifying densities between 20 000 and 50 000 embryos per liter. These microplates were incubated at 24 °C for 24 h in the dark or 20, 22, 26, 28, 30 °C. After incubation, 25 µl of 1% buffered formalin were added and the percentage of abnormal oyster larvae was recorded. Hundred individuals per well were directly observed under inverted microscope (Nikon eclipse TS100/TS100-F; TS100 LED MV/ TS100 LED-F MV) to determine the number of abnormal D-shell larvae according to the criteria described in His et al. (1999) and Quiniou et al. (2005). An important prerequisite reading the test is the presence, in control condition (24 °C in the absence of contamination) of less than 20 % of larval abnormalities. In this experimentation, four different couples were used and four replicates were performed for each conditions.

For oyster’s native from the Arcachon Bay (wild and cultivated), gametes were obtained by stripping mature oysters. For that, gonad is isolated from the rest of the body, put into a beaker with 0.2 µm FSW and then pressed gently to bring out the mature gametes controlled under microscope.

#### 1.4 Statistical analysis

All data is expressed as means ± standard deviation (S.D.). Data was first processed using the transformation:  $p' = \arcsin \sqrt{p}$ . P corresponds to the raw data (frequency of abnormalities) specified in p values from 0 to 1 (Legendre and Legendre, 1998). Homogeneity of variance (Levene’s test) was verified and statistical analysis was performed by the Kruskal-Wallis tests. Differences among data between conditions were then performed using Kruskal post hoc test (equivalent to the tuckey HSD test for non-parametric data). Significance difference was accepted when  $p < 0.05$ . The EC<sub>50</sub> defined here as the toxicant concentrations causing 50% reduction in the embryonic development was calculated by PRISM 5 software (GraphPad software, California, USA). For the joint action toxicity of pollutants and temperature, the synergistic ratio (SR) model after Hewlett and Packett (1969) was used.

$$SR = \frac{\text{EC50 of a chemical acting alone at the reference temperature (24 °C)}}{\text{EC50 of a chemical with different temperature}}$$

Where SR=1 joint action is described as Additive, SR<1 joint action is described as Antagonistic and SR>1 joint action is described as Synergistic.



## 2. Results

### 2.1. Chemical analysis of tested pollutant solution

#### 2.1.1 Copper

Table 2 shows copper concentration determined in control condition and in the contamination solution for experiment with native oysters from the Arcachon Bay in 2014 and with oysters from hatchery. Analysis revealed the presence of copper in reference seawater at concentrations  $<2 \mu\text{g.L}^{-1}$  in 2014 and  $<2.5 \mu\text{g.L}^{-1}$  for hatchery's oysters. At the nominal concentration of  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ , measured concentration reached  $3.3 \mu\text{g.L}^{-1}$  and  $6.20 \mu\text{g.L}^{-1}$  for native and hatchery oysters respectively. Other concentrations did not show important differences between nominal and measured concentrations with a variation range of 10 % and 3.2 % for  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  and  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$  respectively.

Table 2: Copper concentrations ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) determined for exposure solutions for experiments using native or hatchery oysters

	<b>Nominal concentrations</b>	<b>Control</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>50</b>
<b>Measured concentrations</b>	Arcachon	1.8	3.3	11.0	48.4
	Hatchery	2.45	6.20	11.8	48.2

#### 2.1.2 S-Metolachlor

Table 3 shows S-metolachlor concentration determined in control and in the contamination solutions. Background metolachlor levels measured in reference seawater were less than  $5 \text{ng.L}^{-1}$  for native and hatchery oysters respectively. For the  $10 \text{ng.L}^{-1}$  exposure condition, measured concentrations reached  $8.9 \text{ng.L}^{-1}$  for hatchery oysters and were almost two times higher for native oysters. For the 100 and  $1000 \text{ng.L}^{-1}$  conditions, measured concentrations were very close to expected concentrations with variations of 8.1 and 8.4 % for native oysters. For hatchery oysters, for the nominal concentration at  $100 \text{ng.L}^{-1}$ , measured concentrations were almost 2.5 times higher. For the  $1000 \text{ng.L}^{-1}$  exposure, measured concentrations were achieved with a variation range of 27 % compared to nominal concentrations.

Table 3: Metolachlor concentrations ( $\text{ng.L}^{-1}$ ) determined for exposure solutions for experiments using native or hatchery oysters

	<b>Nominal concentrations</b>	<b>Control</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>1000</b>
<b>Measured concentrations</b>	Arcachon	4.6	18.0	108.1	916.0
	Hatchery	4.4	8.9	255.8	731.1

## 2.2. Larval abnormalities

### 2.2.1. Control condition

There is no significant difference of the percentage of larval abnormalities between 22 °C and 24 °C (Fig. 2). Temperature of 24 °C had less than 20% of larval abnormalities. Significant differences are observed between 24 °C and 26 °C for cultivated oysters from Comprian and Les Jacquets and oysters from hatchery. At 20 °C, 28 °C and 30 °C, there is a significant increase of the percentage of larval abnormalities whatever the experimental conditions with no significant difference between themselves.

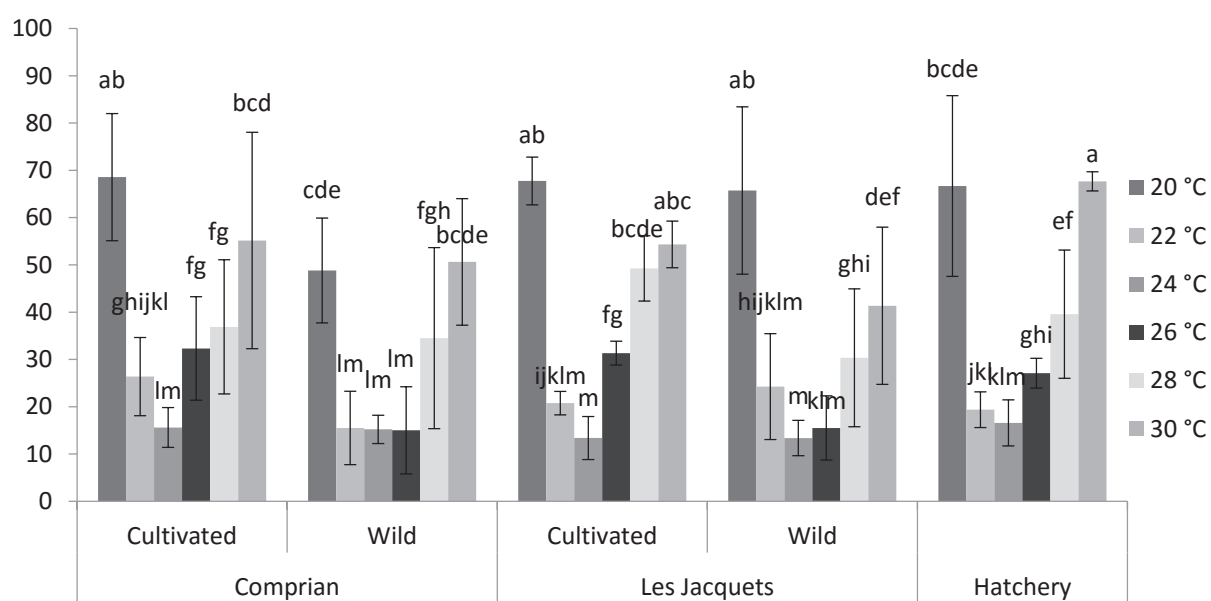


Figure 2: Variation of abnormal D-larvae (Mean  $\pm$  SD) in control larvae as function of temperature (20, 22, 24, 26, 28, 30°C) for wild or cultivated oysters from the Arcachon Bay at different sites or from a commercial hatchery. Different letters indicated significant differences between different concentrations, temperature or study conditions ( $p < 0.05$ )

### 2.2.2 Copper exposure

In control condition, no significant difference is observed between wild/cultivated/hatchery oysters and Comprian/Les Jacquets at 24 °C with less than 20% of larval abnormalities (Fig. 3). Percentage of larval abnormalities increase significantly according to the increase in copper concentrations with an average of about  $31 \pm 13$ ,  $54 \pm 18$ ,  $95 \pm 16$  at 1, 10 and  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$  respectively for oysters native from the Arcachon Bay ;  $42 \pm 5$ ,  $65 \pm 5$ ,  $100 \pm 0$  for hatchery's oysters. No significant difference is observed between Arcachon's oysters and hatchery's oysters. In control condition, normal development of D-larvae was significantly affected by low and high temperatures whatever the origin of oysters. At 28°C, there is no significant difference between control condition and environmental Cu concentration on D-larvae development for oysters from the Arcachon Bay. A higher sensitivity is observed for

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise

hatchery's oysters exposed to copper at 28°C whatever the concentration tested. The number of abnormal D-larvae was highest at 20°C compared to 24 °C whatever the concentration of exposure. At 20 °C, wild oysters from Compiègne appeared more resistant to copper toxicity. On the contrary, hatchery's oysters were generally affected more than those from the Arcachon Bay to copper exposure.

Chapitre 4 – Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryolaire de l’huître creuse Japonaise

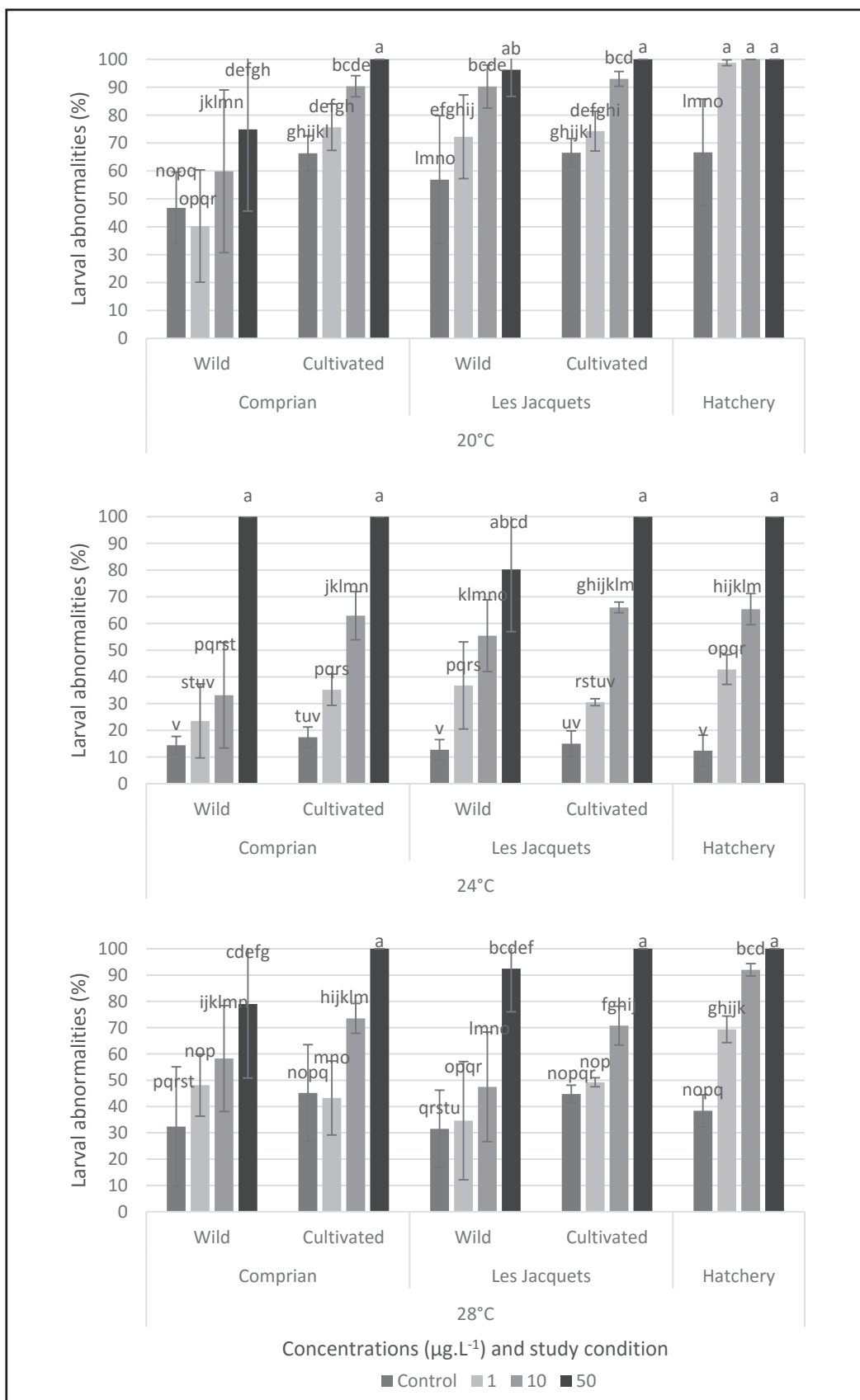


Figure 3: Percentages (Mean ± SD) of abnormal D-larvae following oyster embryo exposure to 1, 10 or 50 µg.L<sup>-1</sup> of copper and different temperatures (20 °C, 24 °C, 28 °C) for wild or cultivated oysters from the Arcachon Bay at different sites or from a commercial hatchery. Different letters indicated significant differences between different concentrations, temperature or study conditions (p < 0.05).

The analysis of dose-response data for copper with different temperature (20 °C, 24 °C and 28 °C) (table 6) showed that the 24hEC<sub>50</sub> values at 24 °C were 9.8 µg.L<sup>-1</sup> for hatchery’s oysters and from 7.4 to 14.8 µg.L<sup>-1</sup> for oysters from the Arcachon Bay. At 20 °C, 24hEC<sub>50</sub> values were of 2.9 µg.L<sup>-1</sup> for hatchery’s oysters and from 1.8 to 7.6 µg.L<sup>-1</sup> for oysters from the Arcachon Bay. At 28 °C, 24hEC<sub>50</sub> values were of 1.4 µg.L<sup>-1</sup> for hatchery’s oysters and from 4 to 9.9 µg.L<sup>-1</sup> for oysters from the Arcachon Bay. The interaction between temperature and copper was found to be synergistic (SR>1) excepted for cultivated oysters from Les Jacquets.

Table 6: Analysis (based on synergistic model) of 24h EC<sub>50</sub> values with 95% confidence intervals (in parenthesis) of copper alone for reference temperature (24°C) and copper with different temperature. SR : synergistic ratio

		EC <sub>50</sub> (95CI) µg.L <sup>-1</sup>	SR
24 °C	Hatchery	9.82 (8.9-10.8)	-
	Wild oysters Comprian	14.8 (11.5-19)	-
	Cultivated oysters Comprian	7.7 (6.7-8.8)	-
	Wild oysters Les Jacquets	10.5 (8.0-14.0)	-
	Cultivated oysters Les Jacquets	7.4 (6.7-8.3)	-
20 °C	Hatchery	2.9 (2.6-3.3)	3.9
	Wild oysters Comprian	7.6 (3.7-15.5)	1.9
	Cultivated oysters Comprian	2.7 (2.3-3.3)	2.8
	Wild oysters Les Jacquets	1.8 (1.3-2.6)	5.6
	Cultivated oysters Les Jacquets	4.8 (3.7-6.4)	1.5
28 °C	Hatchery	5.7 (5.4-6.1)	1.7
	Wild oysters Comprian	4.6 (2.4-8.8)	3.2
	Cultivated oysters Comprian	4.0 (2.9-5.7)	1.9
	Wild oysters Les Jacquets	7.0 (4.9-9.9)	1.5
	Cultivated oysters Les Jacquets	9.9 (8.3-11.9)	0.8

### 2.2.3 Metolachlor exposure

Organisms were exposed to metolachlor under three different temperatures. There is a dose depend increase of abnormal D-larvae exposed to metolachlor. At 24°C, significant difference between control condition and environmental concentration of metolachlor (at nominal concentration of 10 ng.L<sup>-1</sup>) was observed for each oyster groups but with a higher sensitivity of hatchery’s oysters (Fig. 4). However, the two highest concentrations tested do not show more sensitivity of hatchery’s oysters compare to native oysters from the Arcachon Bay. At 28°C, significant difference of the two first concentrations tested compared to 24 °C appears except for wild oysters from Les Jacquets. At 20 °C, in comparison with 24 °C, there is a significant increase of the percentage of larval abnormalities whatever the concentration tested and whatever the study condition. At 20°C and 28°C, hatchery’s oysters appears significantly more sensitive that oysters from the Arcachon Bay whatever the concentration tested.

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryolaire de l’huître creuse Japonaise

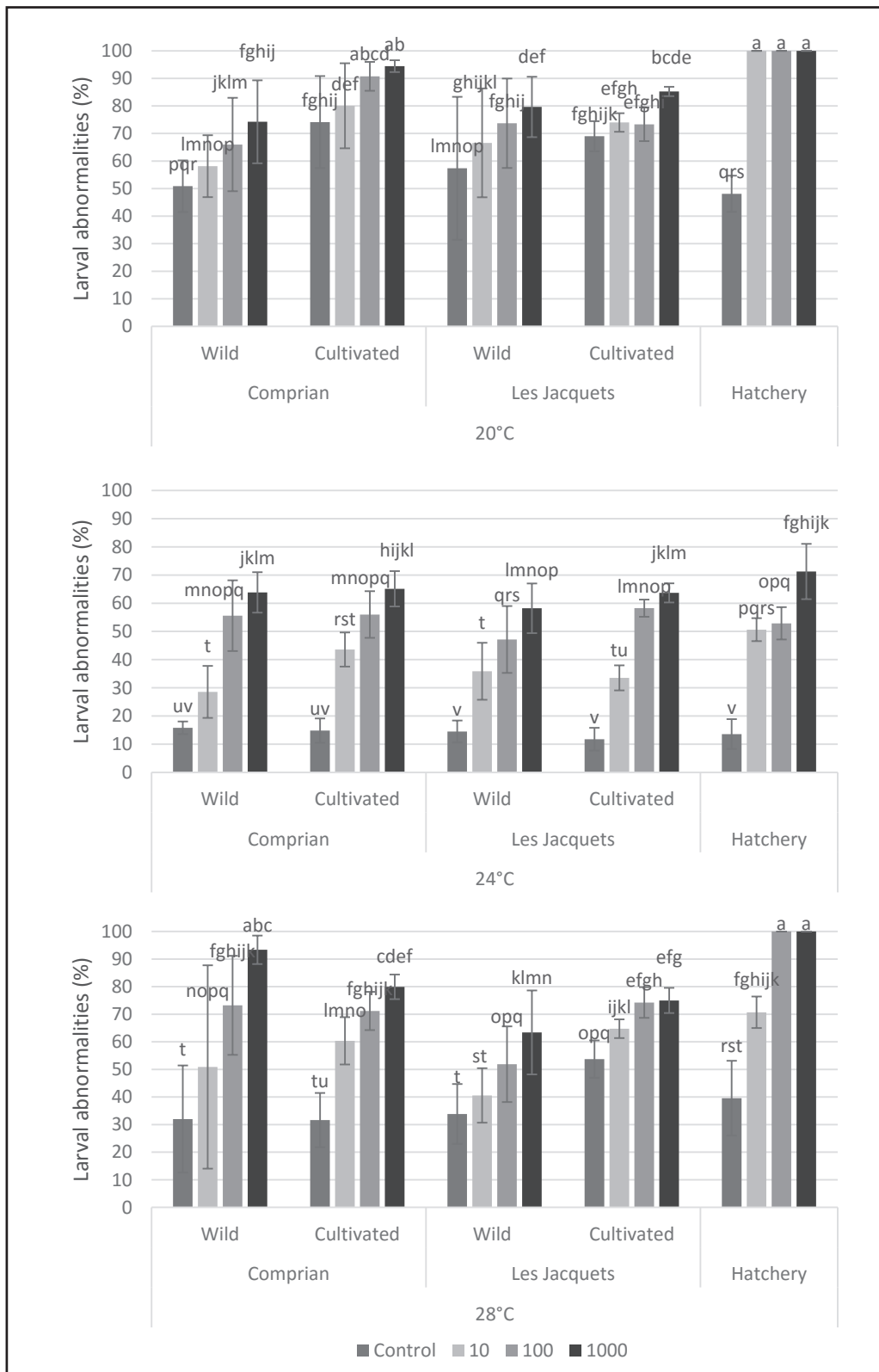


Figure 4: Percentages (Mean ± SD) of abnormal D-larvae following oyster embryo exposure to 10, 100 or 1000 ng.L<sup>-1</sup> of S-metolachlor and different temperature (20 °C, 24 °C, 28 °C) for wild or cultivated oysters from the Arcachon bay at different sites or from a commercial hatchery. Different letters indicated significant differences between different concentrations, temperature or study condition (p < 0.05).

## Discussion

Several recent papers report that climate change may have deleterious effects on the environmental fate and behavior of pollutants altering physical, chemical and biological properties of ecosystems. Heat stress effects on organisms have been investigated for more than 50 years, but studies on interactions of toxic compounds and heat stress are relatively new. It has been shown for a variety of organisms that the upper temperature tolerance limit is decreased in the presence of certain chemical compounds (Holmstrup et al., 2010; Lannig et al., 2006). In the present work, the effects of temperature changes on Cu and S-metolachlor toxicity in the early stages of oyster development were studied.

Chemical analysis was performed to compare nominal concentrations with the true concentrations in our experimental conditions. Copper concentrations for the two highest doses (10 and 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) fit well with expected nominal values. However, at the lowest nominal concentration (1  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), the measured concentration was higher than expected because it also included the metal concentration already present in the reference FSW. Finally, for experiments performed with oysters from the Arcachon Bay, copper concentration obtained at the theoretical concentration of 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  are concentration encountered in the water of the Arcachon Bay during oyster breeding period (Gamain et al., publi 2). At the lowest nominal concentrations of metolachlor (10  $\text{ng.L}^{-1}$ ), concentrations were very close to expected concentrations for hatchery oysters but were almost 2 times higher for native oysters. However, those concentrations are in a range value encountered in the Arcachon Bay (Gamain et al., publi 2). The two highest concentrations fit well with expected nominal values for native oysters. For hatchery oysters, concentrations 2.5 times higher to the nominal concentration of 100  $\text{ng.L}^{-1}$  was obtained. Temperature is an environmental factor of primary importance for successful development of oyster larvae (Dos Santos and Nascimento, 1985; Galtsoff, 1964). In the absence of contamination, for wild or cultivated oysters, at Les Jacquets or Comprian, a decrease of 4 °C is necessary to observe an impact of temperature on D-larvae development. In Arcachon Bay, temperatures of 22 and 24 °C are commonly encountered in waters during spawning period with average of 22.1 °C  $\pm$  1.6 and 22.3 °C  $\pm$  1.7 at Les Jacquets and Comprian respectively from 2007 to 2014 (SOMLIT, 2015). So these temperatures represent ideal temperatures for D-larvae development with less than 20 % of larval abnormalities. These results suggest that problems encountered in the Arcachon Bay are not only due to temperature changes. Moreover, 20 °C is a possible temperature but not a current observed temperature at spawning and development time. A study on native oysters from the Arcachon Bay showed that spawning was not triggered below 20 °C (His, 1976). These results suggested that 20 °C is the minimum temperature for an efficient fertilization and a good embryo-larval development.

#### Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryo-larvaire de l’huître creuse Japonaise

Similarly, Parker and Ross (2010) found a temperature effect on development of embryos of *C. gigas* and *S. glomerata* exposed below or above the normal operational temperature. On the contrary, other studies have shown that D-veliger of *Crassostrea gigas* from Arcachon genitors were able to survive and grow well over a wide range of temperatures 15-30 °C (His et al., 1989a). However, temperatures were tested on D-veliger stages (which have been developed in optimal condition: 24 °C during 24 h) and not on the very early stage of embryo-larval development. Moreover, Mac Iness and Calabrese showed in 1979 that veliger larvae of *Crassostrea virginica* were considerably more tolerant to temperature changes than were the developing embryos. In this way, our results demonstrated this statement.

At 26 °C significant increase of the percentage of larval abnormalities is observed for cultivated oysters compared to wild individuals from the two sampling sites. Wild oysters are present in the Arcachon Bay all their life, and they might develop an adaptation to higher temperature because of their lifestyle. On the opposite, cultivated oysters, during one year, are transferred in other environment to facilitate growth. This could have affected temperature tolerance in cultivated oyster offspring. For *Crassostrea rhizophorae*, a tropical species generally occupying a habitat in which the water temperature is not below 20 °C nor above 30 °C, embryo larval development was impaired by temperature increase with only 6 % of normal D-larvae obtained at 30 °C (Dos Santos and Nascimento, 1985). These results are in accordance with our data. In Arcachon Bay, temperatures do not exceed 26-27 °C during oysters breeding period. Above 26 °C, percentage of larval abnormalities increase significantly according to temperature increase. Similar data were obtained by Helm and Millican (1977) who found that temperature should not exceed 25°C for a great embryonic development of *Crassostrea gigas*. These results suggest that increasing temperatures intended with climate change in the future will certainly affect the normal development of D-larvae. Furthermore, Comprian is located inside the lagoon. The retention time of water is therefore more important (Plus et al., 2009) and temperature changes are more extreme every tide. However, no significant difference of the percentage of larval abnormalities between the two sites shows that there is probably no genitor oysters adaptation transmitted to their progeny to withstand high temperatures. Oysters from hatchery respond in a very similar way than native oysters at each studied temperature.

Temperature is a factor that influences the toxicity of pollutants to aquatic organisms (Gomiero and Viarengo, 2014; Heugens et al., 2003). However, the influence of this environmental parameter on the toxicity of pollutants to marine and estuarine animals is not always clear (Ozoh, 1992), whereas metal toxicity generally increases with rising temperature (Holmstrup et al., 2010). The copper Predicted No Effect Concentration (PNEC) is 0.8 µg.L<sup>-1</sup> for copper (Bisson et al., 2005). In this study a dose response



#### Chapitre 4 – Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Japonaise

effect to copper is observed at the normal operational temperature of 24 °C which is in agreement with previous research in our laboratory (Gamain et al., 2016d; Mai et al., 2014, 2012). Oysters from hatchery appear a little more sensitive to copper with a 24hEC<sub>50</sub> of 9.8 (8.9-10.8) µg.L<sup>-1</sup> in comparison to wild oysters from Les Jacquets or Comprian with 24hEC<sub>50</sub> values of 14.8 (11.5-19) and 10.5 (7.9-13.9) µg.L<sup>-1</sup> respectively. In fact, cultivated oysters seem to be also more sensitive to Cu, in a similar manner than the hatchery oysters, with 24hEC<sub>50</sub> values of 7.7 (6.8-8.8) µg.L<sup>-1</sup> or 7.5 (6.7-8.3) µg.L<sup>-1</sup> for Comprian or Les Jacquets respectively. Oyster embryos produced by wild oysters, which have been living all their life in the Arcachon Bay, might have a higher tolerance to metal stress.

At 20 °C, there is a significant increase of the percentage of larval abnormalities with a synergistic interaction between temperature and copper. Synergistic effects are more important for oysters from hatchery than oysters from the Arcachon Bay (3.9 vs 2.95 ± 1.8). For oysters from the Arcachon, in most cases, there is no characteristic response between cultivated and wild oysters or between Les Jacquets or Comprian, except for D-larvae from Les Jacquets' wild oysters which appear less sensitive to interaction of temperature and copper. Except for this condition, 24hEC<sub>50</sub> values are in the same range for oysters from hatchery or from the Arcachon Bay (2.5 µg.L<sup>-1</sup> vs 1.8 to 4.8 µg.L<sup>-1</sup> respectively). These results demonstrate the high sensitivity of D-larvae to temperature changes and the small window of possible variations to obtain the optimal development.

High temperatures should increase the assimilation of heavy metals as their solubility increased with temperature (Cairns et al., 1975). Thus, metal toxicity generally increases with rising temperatures (MacInnes et Calabrese, 1979; Heugens et al., 2000). Rao and Khan (2000) studied Cu toxicity in the zebra mussel. The authors found that increasing temperatures increased the toxicity of Cu to the mussels and they attributed this effect to higher metabolic rates at higher temperatures leading to higher exposure to the metal. Similarly, in our work, copper toxicity increases with higher temperatures. In fact, at 28 °C there is an exacerbation of the effect of copper on D-larvae development with a percentage of larval abnormalities of 69 % ± 5.06 at 1 µg.L<sup>-1</sup> in comparison to control condition (38 % ± 6.09) for oysters from hatchery. Moreover the 24hEC<sub>50</sub> value obtained of 5.7 µg.L<sup>-1</sup> confirms the extreme sensitivity of D-larvae from hatchery compared to the optimal development temperature (9.8 µg.L<sup>-1</sup>). At 28°C, embryos from the native oysters showed a higher resistance to combined effects of high temperature and copper exposure with a percentage of larval abnormalities of 45.7 % ± 18.3 at the Cu concentration of 1 µg.L<sup>-1</sup> which is lower than hatchery's oysters. Nevertheless, there was also a synergistic impact of elevated temperature and copper on embryos from native oysters (2.2 ± 0.9). The exception to this was for cultivated oysters from Les Jacquets, where a moderate antagonistic mode of action is noticed with SR=0.8. So, at elevated temperature, despite showing mainly a

#### Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryo-larvaire de l’huître creuse Japonaise

synergistic interaction between Cu and temperature, the sensitivity of oysters from different lifestyle or origin was different with oysters from hatchery showing greater sensitivity.

At environmental concentration of Cu, embryos appeared generally more sensitive to the combined effects of pollutant and low temperature than high temperature (Table 7). With embryos of the American oyster (MacInnes and Calabrese, 1979), higher copper toxicity occurred at 20 °C rather than 30 °C, which is in agreement with our results. However, it could be hypothesized that more problems could still arise in the future for the development of oyster larvae in the Arcachon Bay according to global climate change.

*Table 7: Increase factor of the percentage of larval abnormalities between 24 °C/20 °C or 24 °C/28 °C for wild and cultivated oysters from Comprian and Les Jacquets exposed to environmental concentration of copper ( $1\mu\text{g.L}^{-1}$ ).*

		20 °C	28 °C
<b>Comprian</b>	Wild	1.7	2
	Cultivated	2.2	1.2
<b>Les Jacquets</b>	Wild	2	/
	Cultivated	2.4	1.6

To date, few studies on the toxicity of metolachlor have been conducted on aquatic species (Cook and Moore, 2008; Coquillé et al., 2015; Liu and Xiong, 2009; Mai et al., 2014, 2012; Neves et al., 2015; Thakkar et al., 2013). But none has been interested in combined effect of metolachlor and temperature.

The PNEC of S-metolachlor is of  $6700 \text{ ng.L}^{-1}$  in marine water. However, some stages (including embryo-larval and juvenile stages) of aquatic organisms may be more sensitive than others to pesticides (Connor, 1972; Hrs-Brenko et al., 1977; Martin et al., 1981; Quiniou et al., 2005; Wisely and Blick, 1967). This is demonstrated in our study. In fact, embryotoxicity threshold at 24 °C (LOEC) of  $10 \text{ ng.L}^{-1}$  of metolachlor was observed in this study and previous works (Gamain et al., 2016d; Mai et al., 2014, 2012). Oysters from hatchery appear a little more sensitive to environmentally relevant concentration of metolachlor compared to oysters from the Arcachon Bay with  $50 \% \pm 4$  and  $39 \% \pm 8$  of abnormal larvae respectively. At 20 °C, in comparison with 24 °C, there is a significant increase of the percentage of larval abnormalities whatever the concentration tested. Indeed, oysters from different sites and with different lifestyle respond in a same way. However, once again oysters from hatchery are more sensitive to the combined effect of S-metolachlor and low temperature with 100 % of larval abnormalities recorded for each studied pollutant concentration. At 28°C, significant increase of abnormal larvae was observed after metolachlor exposure compared to 24 °C except for wild oysters

from Les Jacquets. These results demonstrated the pesticide toxicity at above-optimum temperatures. At environmental concentration of metolachlor, similarly to the results obtained with Cu, developmental defects were more pronounced at low temperature than at elevated temperature (Table 8). However, the increase factor of elevated temperature combined to metolachlor suggests that more problems could arise for the development of larvae with global climate change.

*Table 8: Increase factor of the percentage of larval abnormalities between 24 °C and 20 °C or 28 °C for wild and cultivated oysters from Comprian and Les Jacquets exposure at environmental concentration of metolachlor (10ng.L<sup>-1</sup>).*

		20 °C	28 °C
<b>Comprian</b>	Wild	2.1	1.8
	Cultivated	1.9	1.4
<b>Les Jacquets</b>	Wild	1.9	1.2
	Cultivated	2.3	2

## Conclusion

The optimal temperature for embryonic development was 24 °C for *C. gigas*. A 4 °C difference from this optimal, cause an increase of the percentage of larval abnormalities. Oysters from the Arcachon Bay appear sensitive to an increase of temperature, suggesting a future increase of the percentage of larval abnormalities with global climate change. From our findings, both of the investigated pollutants showed a clear temperature/toxicity relationship. Therefore, this study supports the growing body of evidence that rising temperature will have negative impacts on the distribution and toxicity of environmental contaminants. With rising temperature, in the context of sustainability of oyster farming, increased of oyster crisis is expected. Oysters from hatchery appear to respond in a same way than oysters from Arcachon Bay to the combined effect of high/low temperature and pollutant but with a higher sensitivity. It represents a good alternative model for studying the effect of pollutant as well as climate change stressors.

## Acknowledgements

The authors thank the Aquitaine Region (OSQUAR Project), CPER A2E, Intermunicipal Union of Arcachon Bay (SIBA) and Water Agency Adour Garonne (AEAG) for their financial support. We gratefully acknowledge the staff of the SEPANSO for their help in obtaining reference seawater. This work was part of the LABEX COTE cluster of excellence "Continental To coastal Ecosystems: evolution, adaptability and governance". The authors would like to thank James Emery for providing English proofreading services.

## References

- Aaseth, J., Norseth, T., 1986. Handbook on the toxicology of metals 2, in: New York, NY : Elsevier Science Publishers. pp. 233–254.
- Adams, S.M., 2005. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems, in: Marine Pollution Bulletin. pp. 649–657. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.11.040
- 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 biomarkers for assessing the effects of pollutant stress on fish. Mar. Environ. Res. 28, 459–464.
- Adour-Garonne, A. de l'eau, 2013. Agence de l'eau Adour-Garonne - Journée technique « Qualité des eaux littorales : suivi et enjeux » Jeudi 20 juin 2013 – Espace culturel de Biganos (33) 1–5.
- Aerts, S., Haesbroeck, G., Ruwet, C., 2015. Multivariate coefficients of variation : Comparison and influence functions. J. Multivar. Anal. 142, 183–198. doi:10.1016/j.jmva.2015.08.006
- Agreste Primeur, 2014. Recensement de la conchyliculture 2012 160 000 tonnes de coquillages commercialisés 1–6.
- Akcha, F., Spagnol, C., Rouxel, J., 2012. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. Aquat. Toxicol. 106-107, 104–113. doi:10.1016/j.aquatox.2011.10.018
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquat. Toxicol. 76, 160–202. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015
- Auby, I., 1991. Contribution à l'étude des herbiers de *Zostera noltii* dans le Bassin d' Arcachon : dynamique, production et dégradation, macrofaune associée. Volume 1 357.
- Auby, I., Bocquene, G., Quiniou, F., Dreno, J.P., 2007. Etat de la contamination du Bassin d'Arcachon par les insecticides et les herbicides sur la période 2005-2006. Impact environnemental 24, 108.
- Auby, I., Bost, C.-A., Budzinski, H., Dalloyau, S., Desternes, A., Belles, A., Trut, G., Plus, M., Pere, C., Couzi, L., Feigne, C., Steinmetz, J., 2011. Régression des herbiers de zostères dans le Bassin d' Arcachon : état des lieux et recherche des causes Régression des herbiers de zostères dans le Bassin d' Arcachon : état des lieux et recherche des causes. Ifremer ODE LER Arcachon 195.
- Auby, I., Maurer, D., 2004a. Etude de la reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon. Ifremer.
- Auby, I., Maurer, D., 2004b. Etude de la reproduction de l' huître creuse dans le Bassin d' Arcachon Rapport final.
- Auby, I., Maurer, D., 2014. Rôle des communautés phytoplanctoniques sur la reproduction de l' huître creuse ( *Crassostrea gigas* ) dans le bassin d' Arcachon 48 p.
- Auby, I., Maurer, D., Connès, C., Barbier, C., Perrière-Rumèbe, M., Rigouin, L., Tournaire, M.-P., 2012. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d' Arcachon Année 2012. IFREMER 1–63.
- Auby, I., Maurer, D., Passoni, S., Heroin, D., Rigouin, L., Méteigner, C., Perrière-Rumèbe, M., Tournaire, M.-P., 2014. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d' Arcachon Année 2014. Ifremer 55.
- Auby, I., Oger-Jeanneret, H., Sauriau, P.-G., Hily, C., Barillé, L., 2010. Angiospermes des côtes françaises Manche-Atlantique. Propositions pour un indicateur DCE et premières estimations de la qualité. Annexe 2 : Fiches contenant les données sur les herbiers des différentes masses d'eau suivies dans le cadre de la DCE 152.

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryo-larvaire de l’huître creuse Japonaise

- Auffret, M., Oubella, R., 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comp. Biochem. Physiol. - A Physiol.* 118, 705–712. doi:10.1016/S0300-9629(97)00017-0
- Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Le Floch, S., Renault, T., 2008. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Toxicol. Vit.* 22, 1610–1617. doi:10.1016/j.tiv.2008.04.011
- Baize, D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France), in: Institut National de La Recherche Agronomique INRA. p. 409.
- Barouki, R., 2006. Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/Sciences* 22, 266–272. doi:10.1016/S0985-0562(02)00173-5
- Barros, P., Sobral, P., Range, P., Chícharo, L., Matias, D., 2013. Effects of sea-water acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 440, 200–206. doi:10.1016/j.jembe.2012.12.014
- Bebianno, M.J., Serafim, M. a., 1998. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. *Sci. Total Environ.* 214, 123–131. doi:10.1016/S0048-9697(98)00059-X
- Beiras, R., Albentosa, M., 2004. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals; implications for the implementation of seawater quality criteria. *Aquaculture* 230, 205–213. doi:10.1016/S0044-8486(03)00432-0
- Beiras, R., His, E., 1995. Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival and growth of *Mytilus galloprovincialis* mussel larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 126, 185–189. doi:10.3354/meps126185
- Belin, C., Neaud-Masson, N., 2012. Cahier de Procédures REPHY 2012-2013 82.
- Ben Kheder, R., 2007. Étude sur le développement larvaire de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) en conditions contrôlées : recherche d’indices de qualité.
- Bernard, G., Bonhomme, P., Boudouresque, C.F., 2005. Recovery of the seagrass *Zostera marina* in a disturbed Mediterranean lagoon (Etang de Berre, Bouches-du-Rhône, Southern France). *Hydrobiologia* 539, 157–161. doi:10.1007/s10750-004-3080-7
- Bernard, I., 2011. Écologie de la reproduction de l’huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les côtes atlantiques françaises : Vers une explication de la variabilité du captage.
- Bessi, H., ElAlami, M., 2009. Les bio-essais dans l’évaluation d’impact des polluants sur les écosystèmes dulçaquicoles. *Les Technol. Lab.* n°15 16–22.
- Bijoux, H., 2014. Étude de l’impact des contaminants chimiques du Bassin d’Arcachon sur l’huître creuse *Crassostrea gigas* ; Approche in situ et expérimentale 387.
- Bird, A., 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396–398. doi:10.1038/nature05913
- Bisson, M., Houeix, N., Gay, G., Lacroix, G., Lefevre, J.P., Magaud, H., Tissot, S., Migne, V., Morin, A., 2005. Cuivre et ses dérivés. *INERIS* 1–66.
- Blanchet, H., 2004. Structure et Fonctionnement des peuplements benthiques du Bassin d’Arcachon 223.
- Bos, A.R., Bouma, T.J., de Kort, G.L.J., van Katwijk, M.M., 2007. Ecosystem engineering by annual intertidal seagrass beds: Sediment accretion and modification. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 74, 344–

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryo-larvaire de l’huître creuse Japonaise

348. doi:10.1016/j.ecss.2007.04.006

- Bouchet, J.-M., Deltreil, J.-P., Manaud, F., Maurer, D., Triff, G., 1997. Etude intégrée du Bassin d’Arcachon. IFREMER Tome 5.
- Bouilly, K., Gagnaire, B., Bonnard, M., Thomasguyon, H., Renault, T., Miramand, P., Lapegue, S., 2006. Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 78, 149–156. doi:10.1016/j.aquatox.2006.02.028
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004a. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, 147–157. doi:10.1016/j.gene.2003.12.027
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004b. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *Gene, an Int. J. genes genomes* 272, 147–157. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04960.x
- Brenko, M.H., Calabrese, A., 1969. The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 4, 224–226.
- Brunel, S., Fraslin, C., Kuperminc, M., Perras, M., Prevost, J., 2013. Agriculture littorale du Bassin d’ Arcachon - Projet « Littoral, Interface terre-mer ». *AgroParisTech* 1–35.
- Buck, K.N., Ross, J.R.M., Russell Flegal, a., Bruland, K.W., 2007. A review of total dissolved copper and its chemical speciation in San Francisco Bay, California. *Environ. Res.* 105, 5–19. doi:10.1016/j.envres.2006.07.006
- Budzinski, H., Tapie, N., Magnan, A., Benyahia, M., 2011. Rapport REPAR 1–23.
- Buestel, D., Ropert, D., Prou, J., Gouilletquer, P., 2009. History, status, and future of oyster culture in France. *J. Shellfish Res.* 28, 813–820.
- Buisson, S., Bouchart, V., Guerlet, E., Malas, J., Costil, K., 2008. Level of contamination and impact of pesticides in cupped oyster, *Crassostrea gigas*, reared in a shellfish production area in Normandy (France). *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 43, 655–664.
- Burnol, A., Duro, L., Grive, M., 2006. Eléments traces métalliques - Guide méthodologique - Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. *INERIS* 1–119. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Bustamante, P., Luna-Acosta, a., Clemens, S., Cassi, R., Thomas-Guyon, H., Warnau, M., 2012. Bioaccumulation and metabolisation of 14C-pyrene by the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed via seawater. *Chemosphere* 87, 938–944. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.049
- Cairns, J., HEATH, A.G., PARKER, B.C., 1975. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia* 47, 135–171.
- Cajaraville, M., Bebianno, M., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the *Iberian Peninsula*: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295–311.
- Calabrese, A., 1969. Individual and combined effects of salinity and temperature on embryos and larvae of the coot clam, *Mulinia lateralis* (Say). *Mar. Biol. Lab.* 137, 417–428.
- Calabrese, A., Collier, S., Nelson, D. a, Macinnes, J.R., 1973. The Toxicity of Heavy Metals to Embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 66, 162–166. doi:10.1007/BF00367984
- Calvet, R., 1989. Adsorption of organic chemicals in soils. *Environ. Health Perspect.* 83, 145–177.

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise

doi:10.1289/ehp.8983145

- Campbell, Reece, 2004. La biotechnologie-Chapitre 20, in: Biologie, 2e Edition. p. 1364.
- Carbonell, G., Tarazona, J., 1994. Toxicokinetics of copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 29, 213–221.
- Carriger, J.F., Rand, G.M., 2008. Aquatic risk assessment of pesticides in surface waters in and adjacent to the Everglades and Biscayne National Parks: I. Hazard assessment and problem formulation. *Ecotoxicology* 17, 660–679. doi:10.1007/s10646-008-0230-0
- Castaños, C., Pascual, M., Camacho, A.P., 2009. Reproductive biology of the nonnative oyster, *Crassostrea gigas* (thunberg, 1793), as a key factor for its successful spread along the rocky shores of northern patagonia, argentina. *J. Shellfish Res.* 28, 837–847.
- Chapman, P.M., Long, E.R., 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 14, 81–84. doi:10.1016/0025-326X(83)90305-3
- Chen, M., Yang, H., Delaporte, M., Zhao, S., 2007. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge. *Aquaculture* 271, 479–487. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.051
- Cheng, T., Combes, C., 1990. Influence of environmental factors on the invasion of molluscs by parasites: with special reference to Europe, in: Kluwer Academic Publishers. pp. 307–332.
- Choi, Y.K., Jo, P.G., Choi, C.Y., 2008. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 147, 286–92. doi:10.1016/j.cbpc.2007.11.002
- Claisse, D., Alzieu, C., 1993. Copper contamination as a result of antifouling paint regulations? *Mar. Pollut. Bull.* 26, 395–397. doi:10.1016/0025-326X(93)90188-P
- Clark, G.M., Goolsby, D.A., Battaglin, W.A., 1999. Seasonal and annual load of herbicides from the Mississippi River basin to the Gulf of Mexico. *Environ. Sci. Technol.* 33, 981–986. doi:10.1021/es980962u
- Cochennec-laureau, N., 2015. Rapport d’activités 2014 Laboratoire Environnement Ressources du Morbihan-Pays de Loire.
- Cochennec-Laureau, N., Baud, J.P., 2011. Bilan des surmortalités des huîtres creuses *Crassostrea gigas* depuis 2008. *Bull. épidémiologique* 42, 2–5.
- Cognie, B., Haure, J., Barillé, L., 2006. Spatial distribution in a temperate coastal ecosystem of the wild stock of the farmed oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 259, 249–259. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.05.037
- Connor, P.M., 1972. Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 3, 190–192.
- Cook, M.E., Moore, P. a., 2008. The effects of the herbicide metolachlor on agonistic behavior in the crayfish, *Orconectes rusticus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 94–102. doi:10.1007/s00244-007-9088-z
- Coquillé, N., Jan, G., Moreira, A., Morin, S., 2015. Use of diatom motility features as endpoints of metolachlor toxicity. *Aquat. Toxicol.* 158, 202–210. doi:10.1016/j.aquatox.2014.11.021
- Cotter, E., Malham, S.K., O’Keefe, S., Lynch, S. a., Latchford, J.W., King, J.W., Beaumont, A.R., Culloty, S.C., 2010a. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea:

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise

- The influence of growth, biochemistry and gametogenesis. *Aquaculture* 303, 8–21. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.02.030
- Cotter, E., Malham, S.K., O’Keeffe, S., Lynch, S.A., Latchford, J.W., King, J.W., Beaumont, A.R., Culloty, S.C., 2010b. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of growth, biochemistry and gametogenesis. *Aquaculture* 303, 8–21. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.02.030
- Cousins, R., 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* 65, 238–309.
- Crespo, A., 2009. Présence et sources des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le Bassin d’Arcachon 458.
- Cunningham, F.X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K. a, DellaPenna, D., Gantt, E., 1996. Functional analysis of the B and E lycopene cyclase enzymes of arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 8, 1613–1626.
- Czernichowski-Lauriol, I., Caudron, M., 1999. Pollution des eaux souterraines et superficielles par des produits phytosanitaires dans un même bassin hydrogéologique - Application dans le bassin de la Serre, département de l’Aisne. Rap. BRGM R 40615 71.
- Dagens, N., 2012. Réseau Pesticides Bassin d’Arcachon (REPAR) - Rapport d’étude - Les pratiques phytosanitaires agricoles et non agricoles sur le Bassin d’Arcachon 73.
- Dameron, C., Howe, P., 1998. Copper environmental health criteria n°200, World Health Organization. Geneva.
- Damiens, G., His, E., Quiniou, F., Roméo, M., 2004. Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comp. Biochem. Physiol. - Part C Toxicol. Pharmacol.* 138, 121–128.
- Damiens, G., Mouneyrac, C., Quiniou, F., His, E., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., 2006. Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*. *Environ. Pollut.* 140, 492–499. doi:10.1016/j.envpol.2005.08.006
- Davarpanah, E., Guilhermino, L., 2015. Single and combined effects of microplastics and copper on the population growth of the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 167, 269–275. doi:10.1016/j.ecss.2015.07.023
- Depledge, M., 1994. The rationale basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. Non destructive biomarkers in vertebrates, in: FOSSI, M.C., LEONZIO, C., Eds. Lewis Publishers. pp. 271–296.
- Deslous-Paoli, J., 1981. Toxicité des éléments métalliques dissous pour les larves d’organismes marins : données bibliographiques. *Rev. des Trav. l’Inst. des pêches Marit.* 45, 73–83.
- Devi, M., Thomas, D., Barber, J., Fingerman, M., 1996. Accumulation and physiological and biochemical effects of Cadmium in a simple aquatic food chain. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 38–43.
- Devier, M.-H., 2003. Etude intégrée sur l’impact des différentes classes de contaminants (composés organostanniques, métaux, HAP, PCB) sur les moules. Bioaccumulation et réponses biochimiques.
- Di Poi, C., Evariste, L., Serpentine, A., Halm-Lemeille, M.P., Lebel, J.M., Costil, K., 2013. Toxicity of five antidepressant drugs on embryo-larval development and metamorphosis success in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 13302–13314. doi:10.1007/s11356-013-2211-y



Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryo-larvaire de l’huître creuse Japonaise

- Doney, S.C., Ruckelshaus, M., Emmett Duffy, J., Barry, J.P., Chan, F., English, C. a, Galindo, H.M., Grebmeier, J.M., Hollowed, a B., Knowlton, N., Polovina, J., Rabalais, N.N., Sydeman, W.J., Talley, L.D., 2012. Climate change impacts on marine ecosystems. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 4, 11–37. doi:10.1146/annurev-marine-041911-111611
- Doroudi, M., Southgate, P., Mayer, R., 1999. The combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.). *Aquac. Res.* 30, 271–277.
- Dorsey, A., Ingerman, L., Swarts, S., Corporation, S.R., 2004. Toxicological profile for copper. Agency Toxic Subst. Dis. Regist. Div. Toxicol. Inf. Branch 314.
- Dos Santos, A.E., Nascimento, I.A., 1985. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* guilding, 1828. *Aquaculture* 47, 335–352.
- Dos santos, A.E., Nascimento, I.A., 1985. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* guilding , 1828 47, 335–352.
- Du, Y., Zhang, L., Xu, F., Huang, B., Zhang, G., Li, L., 2013. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) development by quantitative real-time PCR. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 939–945. doi:10.1016/j.fsi.2012.12.007
- Dubourg, B., 2012. Les huîtres triploïdes en plein débat. *Sud Ouest*.
- Echeverrigaray, Gomes, Tavares, 1999. Isolation and characterization of Ca<sup>2+</sup>-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 15, 679–681.
- Eisenreich, S.J., JRC, I.I., C. Bernasconi, P. Campostrini, A. De Roo, G. George, A.-S., Heiskanen, J. Hjorth, N. Hoepffner K.C. Jones, P. Noges, N., Pirrone, N. Runnalls, F. Somma, N. Stilanakis, G. Umlauf, W., van de Bund, P. Viaroli, J. Vogt, J.-M.Z., 2005. Climate Change and the European Water Dimension 1–253.
- Ettajani, H., Amiard, J.C., 1995. Biodisponibilité de quelques métaux fixés sur les matières en suspension (MES) en milieu estuarien. *Hydroécologie Appliquée* 7, 75–89. doi:10.1051/hydro:1995005
- FAO, 2010. LA SITUATION MONDIALE DES PÊCHES ET DE L’AQUACULTURE - 2010. Département des pêches l’aquaculture la FAO. Organ. des nations Unies pour l'alimentation l'agriculture Rome, 241 p.
- Farcy, E., Fleury, C., Lelong, C., Dubos, M.P., Voiseux, C., Fiévet, B., Lebel, J.M., 2008. Molecular cloning of a new member of the p53 family from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and seasonal pattern of its transcriptional expression level. *Mar. Environ. ...* 66, 300–308. doi:10.1016/j.marenvres.2008.04.006
- Farcy, É., Voiseux, C., Lebel, J.M., Fiévet, B., 2009. Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress Chaperones* 14, 371–380. doi:10.1007/s12192-008-0091-8
- Fauvelle, V., N, M., F, D., K, M., M, E., H., B., 2012. Use of mixed-mode ion exchange sorbent for the passive sampling of organic acids by polar organic chemical integrative sampler (POCIS). *Environ. Sci. Technol.* 46, 13344–53. doi:10.1021/es3035279
- Fitzpatrick, J.L., Nadella, S., Bucking, C., Balshine, S., Wood, C.M., 2008. The relative sensitivity of sperm, eggs and embryos to copper in the blue mussel (*Mytilus trossulus*). *Comp. Biochem.*

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise

Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 147, 441–9. doi:10.1016/j.cbpc.2008.01.012

Flemming, C.A., Trevors, J.T., 1989a. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. Water. Air. Soil Pollut. doi:10.1007/BF00228784

Flemming, C.A., Trevors, J.T., 1989b. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. Water. Air. Soil Pollut. 44, 143–158.

Fujiya, M., 1970. Oyster farming in Japan. Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen 20, 464–479. doi:10.1007/BF01609922

Gacia, E., Duarte, C.M., 2001. Sediment Retention by a Mediterranean *Posidonia oceanica* Meadow: The Balance between Deposition and Resuspension. Estuar. Coast. Shelf Sci. 52, 505–514. doi:DOI: 10.1006/ecss.2000.0753

Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Fish Shellfish Immunol. 20, 536–547.

Galay-Burgos, M., Spurgeon, D.J., Weeks, J.M., Stürzenbaum, S.R., Morgan, a J., Kille, P., 2003. Developing a new method for soil pollution monitoring using molecular genetic biomarkers. Biomarkers 8, 229–39. doi:10.1080/354750031000138685

Galtsoff, P., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Fish. Bull. 64, 480.

Gamain, P., Agnès Feurtet-Mazel Régine Maury-Brachet Isabelle Aubry, A.B.H.B., Daffe, G., Gonzalez, P., 2016a. Experimental ecotoxicological study of the impact of a cocktail of pesticides and copper on the seagrass *Zostera noltei* in the Arcachon bay. En préparation.

Gamain, P., Cachot, J., Gonzalez, P., Gourves, P.Y., Budzinski, H., Morin, B., 2016b. Do temporal and spatial parameters or lifestyle of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* broodstock native from the Arcachon Bay (Southwest coast of France) affect pollutant bioaccumulation, offspring development and tolerance to pollutants? En préparation.

Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Clérendean, C., Budzinski, H., Mazella, N., Martin, C., Gourves, P.Y., Morin, B., 2016c. Influence of the combined effects of temperature and pollutants on embryonic-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. En préparation.

Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Pardon, P., Tapie, N., Gourves, P.Y., Budzinski, H., Morin, B., 2016d. Combined effects of pollutants and salinity on embryonic-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Mar. Environ. Res. 113, 31–38. doi:10.1016/j.marenvres.2015.11.002

Ganthy, F., 2011. Rôle des herbiers de zostères (*Zostera noltii*) sur la dynamique sédimentaire du Bassin d’Arcachon 284.

Gasch, a P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O., 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. Mol. Biol. Cell 11, 4241–4257. doi:10.1091/mbc.11.12.4241

Geffard, O., 2001. Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : évaluation chimique et biologique, biodisponibilités des contaminants sédimentaires.

Geffard, O., Budzinski, H., His, E., 2002. The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. Ecotoxicology 11, 403–416. doi:10.1023/A:1021024415695

Geffard, O., Budzinski, H., LeMenach, K., 2004. " petroleum: Bio-tests applied to petroleum water-

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise

- accommodated fractions and natural contaminated samples. *Aquat. Living Resour.* 17, 289–296. doi:10.1051/alr
- Geracitano, L. a., Luquet, C., Monserrat, J.M., Bianchini, a., 2004. Histological and morphological alterations induced by copper exposure in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). *Mar. Environ. Res.* 58, 263–267. doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.069
- Gerard, A., Boudry, P., Launav, S., Heurtebise, S., Phelipot, L.E.T.P., 1995. Contrôle de la Gamétogenèse des huîtres creuses et plates . Relations “ Reproduction ” Et “ Génétique .”
- Gervais, O., Renault, T., Arzul, I., 2015. Induction of apoptosis by UV in the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 232–242. doi:10.1016/j.fsi.2015.05.046
- Gieskes, J.M., Han, S., Rathburn, A., Rothwell, G., Pérez, M.E., Porrachia, M., Barbanti, A., Deheyn, D.D., 2015. Anthropogenic contaminants in Venice Lagoon sediments and their pore fluids: Results from the SIOSED Project. *Mar. Chem.* 174, 73–84. doi:10.1016/j.marchem.2015.05.008
- Gilliom, R.J., 2007. Pesticides in U.S. streams and groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3408–3414. doi:10.1021/es072531u
- Goberville, E., Beaugrand, G., Sautour, B., Tréguer, P., 2010. Climate-driven changes in coastal marine systems of western Europe. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 408, 129–147. doi:10.3354/meps08564
- Gomiero, A., Viarengo, A., 2014. Effects of elevated temperature on the toxicity of copper and oxytetracycline in the marine model, *Euplotes crassus*: A climate change perspective. *Environ. Pollut.* 194, 262–271.
- Greenwood, P., 1981. Some effects of temperature-salinity combinations on the early development of the sea urchin *Parechinus angulosus* (Leske). *Fertilization. J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 51, 119–131.
- Groisman, P.Y., Karl, T.R., Easterling, D.R., Knight, R.W., Jamason, P.F., Hennessy, K.J., Suppiah, R., Page, C.M., Wibig, J., Fortuniak, K.V.N., Douglas, A., Førland, E., Zhai, P.-M., 1999. Change in the probability of heavy precipitation : important indicators of climatic change. *Clim. Change* 42, 243–283.
- Guimaraes, A., Linden, R., 2004. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.* 271, 1638–1650. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04084.x
- Gunkel, G., Streit, B., 1980. Mechanisms of bioaccumulation of herbicide (atrazine, s-triazine) in a freshwater mollusc (*Ancylus fluviatilis mull.*) and a fish (*Coregonus fera jurine*). *Water Res.* 14, 1573–1584.
- Hadfield, M.G., 2000. Why and how marine-invertebrate larvae metamorphose so fast. *CELL Dev. Biol.* 11, 437–443. doi:10.1006/scdb.2000.0197
- Hamdoun, A.M., Cheney, D.P., Cherr, G.N., 2003a. Phenotypic Plasticity of HSP70 and HSP70 Gene Expression in the Pacific Oyster ( *Crassostrea gigas* ): Implications for Thermal Limits and Induction of Thermal Tolerance. *Biol. Bull.* 205, 160–169.
- Hamdoun, A.M., Cheney, D.P., Cherr, G.N., Box, P.O., Bay, B., Ave, S., Toxicology, E., Davis, C., 2003b. Phenotypic Plasticity of HSP70 and HSP70 Gene Expression in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*): Implications for Thermal Limits and Induction of Thermal Tolerance 160 –169. doi:10.2307/1543236
- Hartmann, D.J., Klein Tank, A.M.G., Rusticucci, M., Alexander, L. V, Brönnimann, S., Charabi, Y.A.-R., Dentener, F.J., Dlugokencky, E.J., Easterling, D.R., Kaplan, A., Soden, B.J., Thorne, P.W., Wild, M., Zhai, P., 2013. Observations: Atmosphere and Surface. *Clim. Chang.* 2013 Phys. Sci. Basis. Contrib.

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise

- Work. Gr. I to Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang. 159–254. doi:10.1017/CBO9781107415324.008
- Helm, M.M., Millican, P.F., 1977. Experiments in the hatchery rearing of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 11, 1–12.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry : role of free radicals, *Rhinology. Supplement.* doi:10.1159/0003199858
- Heugens, E.H.W., Jager, T., Creighton, R., Kraak, M.H.S., Hendriks, a. J., Van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2003. Temperature-dependent effects of cadmium on *daphnia magna*: Accumulation versus sensitivity. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2145–2151. doi:10.1021/es0264347
- His, E., 1976. La detection des pontes dans le milieu naturel : application de l'ostréographie a l'etude de la reproduction des huîtres. *Haliotis* 5, 10.
- His, E., 1991. Biologie et écotoxicologie des végétales de *Crassostrea gigas* (Thunberg) dans le Bassin d'Arcachon.
- His, E., Beiras, R., Quiniou, F., Parr, A.C.S., Smith, M.J., Cowling, M.J., Hodgkiss, T., 1996. The non-toxic effects of a novel antifouling material on oyster culture. *Water Res.* 30, 2822–2825.
- His, E., Beiras, R., Silhouette, C., 1997. A Simplification the Bivalve Embryogenesis and Larval Development Bioassay Method for Water Quality Assessment. *Water. Res* 31, 351–355. doi:10.1016/S0043-1354(96)00244-8
- His, E., Heyvang, I., Geffard, O., De Montaudouin, X., 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Res.* 33, 1706–1718. doi:10.1016/S0043-1354(98)00381-9
- His, E., Robert, R., 1982. Le danger des traitements par le sulfate de cuivre en zone conchylicole : toxicité vis-à-vis des oeufs et des jeunes larves de *Crassostrea gigas*. *Rev. des Trav. l'Institut des Pêches Marit.* 45, 117–125.
- His, E., Robert, R., Dinét, A., 1989a. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*.
- His, E., Robert, R., Dinét, A., 1989b. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 100, 455–463.
- His, E., Seaman, M., 1993. Effects of twelve pesticides on larvae of oysters (*Crassostrea gigas*) and on two species of unicellular marine algae (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*). *ICES Mar. Environ. Qual. Comm.* 8.
- Hodson, P., Borgmann, U., Shear, H., 1979. Copper in the environment: Part 2 Health Effects, in: J. O. Nriagu, Ed., John Wiley & Sons Ltd, Toronto. pp. 307–372.
- Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P.J., Hooten, A.J., Steneck, R.S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C.D., Sale, P.F., Edwards, A.J., Caldeira, K., Knowlton, N., Eakin, C.M., Iglesias-Prieto, R., Muthiga, N., Bradbury, R.H., Dubi, A., Hatziolo, M.E., 2007. Coral reefs under rapid climate change and Ocean Acidification. *Sci. mag* 318, 1737–1742.
- Hollows, C., Johnston, E., Marshall, D., 2007. Copper reduces fertilization success and exacerbates Allee effects in the field. *Mar. Pollut. Bull.* 333, 51–60.
- Holmstrup, M., Bindsbøl, A.-M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.-R., Loureiro, S., Soares,

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryo-larvaire de l’huître creuse Japonaise

- A.M.V.M., Ferreira, A.L.G., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P.E., Bayley, M., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Sci. Total Environ.* 408, 3746–3762. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.10.067
- Horiguchi, T., Imai, T., Cho, H.S., Shiraishi, H., Shibata, Y., Morita, M., Shimizu, M., 1998. Acute toxicity of organotin compounds to the larvae of the rock shell, *Thais clavigera*, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the giant abalone, *Haliotis madaka*. *Mar. Environ. Res.* 46, 469–473. doi:10.1016/S0141-1136(97)00058-5
- Hrs-Brenko, M., 1981. The growth and survival of larvae of several bivalve species at high temperatures and the practicability of their culture in heated effluent waters. *Acta Biol. Iugosl. Ichthyol.* 13, 29–37.
- Hrs-Brenko, M., Calabrese, A., 1969. The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 4, 224–226.
- Hrs-Brenko, M., Claus, C., Bubic, S., 1977. Synergistic effects of lead, salinity and temperature on embryonic development of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biol.* 44, 109–115. doi:10.1007/BF00386951
- Hung, T.-C., Meng, P.-J., Han, B.-C., Chuang, A., Huang, C.-C., 2001. Trace metals in different species of mollusca, water and sediments from Taiwan coastal area. *Chemosphere* 44, 833–841.
- Ifremer, 2008. Impact potentiel des activités nautiques sur la qualité des eaux du Bassin d’ Arcachon. IFREMER 35.
- Ifremer, 2009. Fiche d’ information Ifremer - Les huîtres triploïdes - Fiche Aquaculture du 27 novembre 2009.
- Ifremer, 2014. Qualité du Milieu Marin Littoral - Bulletin de la surveillance - Edition 2014 131.
- IPCC, 2013. Working group I contribution to the IPCC fifth assessment report climate change 2013 : The physical science basis final draft underlying scientific-technical assessment.
- Jones, C.G., Lawron, J.H., Shachak, M., 1997. Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology* 78, 1946–1957. doi:10.1890/0012-9658(1997)078[1946:PANEEO]2.0.CO;2
- Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M., 1994. Organisms as Ecosystem Engineers Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69, 373–386.
- Kinne, 1964. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. II. Salinity and temperature-salinity combinations. *Ocean. Mar. Biol. Annu. Rev.* 2, 281–339.
- Ko, G.W.K., Dineshram, R., Campanati, C., Vera, C.B.S., Havenhand, J., Thiyagarajan, V., 2014. Interactive Effects of Ocean Acidification, Elevated Temperature and Reduced Salinity on Early-Life Stages of the Pacific Oyster. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10079–10088. doi:10.1021/es501611u
- Kroeker, K.J., Kordas, R.L., Crim, R., Hendriks, I.E., Ramajo, L., Singh, G.S., Duarte, C.M., Gattuso, J.P., 2013. Impacts of ocean acidification on marine organisms: Quantifying sensitivities and interaction with warming. *Glob. Chang. Biol.* 19, 1884–1896. doi:10.1111/gcb.12179
- Kroeker, K.J., Kordas, R.L., Crim, R.N., Singh, G.G., 2010. Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecol. Lett.* 13( 11), 1419–1434.
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R., 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* (80- ). 319, 1827–1830. doi:10.1126/science.1153069

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise

- Kumar, a., Correll, R., Grocke, S., Bajet, C., 2010. Toxicity of selected pesticides to freshwater shrimp, *Paratya australiensis* (Decapoda: Atyidae): Use of time series acute toxicity data to predict chronic lethality. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 360–369. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.09.001
- Kurihara, H., Kato, S., Ishimatsu, A., 2007. Effects of increased seawater pCO<sub>2</sub> on early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Biol.* 1, 91–98. doi:10.3354/ab00009
- Lahman, S.E., Trent, K.R., Moore, P. a., 2015. Sublethal copper toxicity impairs chemical orientation in the crayfish, *Orconectes rusticus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 369–377. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.12.022
- Lannig, G., Flores, J.F., Sokolova, I.M., 2006. Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: Pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquat. Toxicol.* 79, 278–287.
- Lauenstein, G.G., 1995. Comparison of organic contaminants found in mussels and oysters from a current mussel watch project with those from archived mollusc samples of the 1970s. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 826–833. doi:10.1016/0025-326X(95)00089-6
- Le Berre, I., Hily, C., Lejart, M., Gouill, R., 2009. Analyse spatiale de la prolifération de *C. gigas* en Bretagne. *Cybergeog Eur. J. Geogr. Environnement, Nature, Paysage.* doi:10.4000/cybergeog.22818
- Le Berre, S., Courtel, J., Brigand, L., 2010. Etude de la fréquentation nautique du Bassin d’Arcachon - Rapport final. Dir. régionale des Aff. Marit. Aquitaine – Serv. départemental Arcachon Géomer, Umr 6554 LETG – Univ. Bretagne Occident. 102.
- Legendre, Legendre, 1998. Numerical ecology. Transformation 1–4.
- Legoff, F., Bonnomet, V., 2004. Devenir et comportement des métaux dans l’ eau : biodisponibilité et modèles BLM Rapport technique Devenir et comportement des métaux dans l’ eau : biodisponibilité et modèles BLM Rapport technique. INERIS 87.
- Lehotay, S.J., Harman-fetcho, J.A., Mcconnell, L.L., 1998. Agricultural Pesticide Residues in Oysters and Water from Two Chesapeake Bay Tributaries 37, 32–44.
- Lejart, M., 2009. Etude du processus invasif de *Crassostrea gigas* en Bretagne: Etat des lieux, dynamique et conséquences écologiques.
- Leverett, D., Thain, J., 2013. Oyster embryo-larval bioassay ( revised ), in: ICES TECHNIQUES IN MARINE ENVIRONMENTAL SCIENCES. p. 38.
- Lewbart, G.A., 2011. No Title, in: Invertebrate Medicine, 2nd Edition. p. 504.
- Liang Liang, Z., Hun Kim, Y., Feng Zhang, Z., Min Lim, S., Ho Kang, K., 2009. Water temperature and salinity tolerance of embryos and spat of the mussel, *Musculista senhousia*. *Korean J.Malacol.* 25, 179–187.
- Lin, H., Hsu, S., Hwang, P.P., 2000. Maternal transfer of cadmium tolerance in larval *Oreochromis mossambicus*. *J. Fish Biol.* 57, 239–249.
- Lindquist, S., Craig, E.A., 1988. The heat-shock proteins.
- Littaye, A., Dantas, M., Hubert, R., 2011. Projet de parc naturel marin sur le bassin d’Arcachon et son ouvert. Agence des aires Mar. protégées 152.
- Liu, H., Xiong, M., 2009. Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metolachlor to *Chlorella pyrenoidosa*. *Aquat. Toxicol.* 93, 100–106. doi:10.1016/j.aquatox.2009.04.006

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryo-larvaire de l’huître creuse Japonaise

- Liu, H., Ye, W., Zhan, X., Liu, W., 2006. A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 451–455. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.02.002
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lough, R., Gonor, J., 1971. Early embryonic stages of *Adula californiensis* (Pelecypoda : Mytilidae) and the effect of temperature and salinity on developmental rate. *Mar. Biol.* 8, 118–125.
- Loureiro, S., Newton, A., Icely, J., 2006. Boundary conditions for the European Water Framework Directive in the Ria Formosa lagoon, Portugal (physico-chemical and phytoplankton quality elements). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 67, 382–398. doi:10.1016/j.ecss.2005.11.029
- Lucas, C.H., Horton, A.A., 2014. Short-term effects of the heavy metals, Silver and copper, on polyps of the common jellyfish, *Aurelia aurita*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 461, 154–161. doi:10.1016/j.jembe.2014.08.003
- Luna-acosta, A., Renault, T., Thomas-guyon, H., Faury, N., Saulnier, D., Budzinski, H., 2012. Chemosphere Detection of early effects of a single herbicide ( diuron ) and a mix of herbicides and pharmaceuticals ( diuron , isoproturon , ibuprofen ) on immunological parameters of Pacific oyster ( *Crassostrea gigas* ) spat. *Chemosphere* 87, 1335–1340. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.02.022
- Luo, L., Ke, C., Guo, X., Shi, B., Huang, M., 2014. Metal accumulation and differentially expressed proteins in gill of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) exposed to long-term heavy metal-contaminated estuary. *Fish Shellfish Immunol.* 38, 318–329. doi:10.1016/j.fsi.2014.03.029
- MacInnes, J.R., Calabrese, a., 1979. Combined effects of salinity, temperature, and copper on embryos and early larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 8, 553–562. doi:10.1007/BF01055036
- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H., Morin, B., 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2663–2670. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.10.009
- Mai, H., Gonzalez, P., Pardon, P., Tapie, N., Budzinski, H., Cachot, J., Morin, B., 2014. Comparative responses of sperm cells and embryos of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to exposure to metolachlor and its degradation products. *Aquat. Toxicol.* 147, 48–56. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.024
- Mai, H., Morin, B., Pardon, P., Gonzalez, P., Budzinski, H., Cachot, J., 2013. Environmental concentrations of irgarol , diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster , *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 89, 1–8. doi:10.1016/j.marenvres.2013.04.003
- Maniez, C., Laug, M., 2009. Captage du CO<sub>2</sub> dans l’atmosphère, Ecole des Mines Douai.
- Manzo, S., Miglietta, M.L., Rametta, G., Buono, S., Di Francia, G., 2013. Embryotoxicity and spermotoxicity of nanosized ZnO for Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*. *J. Hazard. Mater.* 254-255, 1–7. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.03.027
- Mao, H., Wang, D.H., Yang, W.X., 2012a. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquat. Toxicol.* 110-111, 208–213. doi:10.1016/j.aquatox.2012.01.018
- Mao, H., Wang, D.-H., Yang, W.-X., 2012b. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquat. Toxicol.* 110-111, 208–213. doi:10.1016/j.aquatox.2012.01.018

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryo-larvaire de l’huître creuse Japonaise

- Marchand, M., Amouroux, I., Bédier, E., Belin, C., Claisse, D., Durand, G., Soudant, D., 2015. Qualité du Milieu Marin Littoral Synthèse Nationale de la Surveillance 2013- Edition 2015 1–60.
- Marie, V., Baudrimont, M., Boudou, A., 2006. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65, 609–617. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.01.074
- Marshall, D., 2008. Transgenerational plasticity in the sea: context-dependent maternal effects across the life history. *Ecology* 89, 418–427.
- Martin, M., Osborn, K.E., Billig, P., Glickstein, N., 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 12, 305–308. doi:10.1016/0025-326X(81)90081-3
- Mason, R.P., 2013. Trace metals and organisms: Essential and toxic metals, organometallics, microbial processes, and metal bioaccumulation, in: *Trace Metals in Aquatic Systems*. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, UK. pp. 370–421. doi:10.1002/9781118274576
- Maurer, D., Auby, I., Moran, A., Barbier, C., Perrière-rumèbe, M., Tournaire, M.-P., Isabelle, A., Connes, C., 2011. Reproduction de l’huître creuse dans le Bassin d' Arcachon - Année 2011. Ifremer (LER AR). 61.
- Maurer, D., Auby, I., Passoni, S., Méteigner, C., Rigouin, L., Perrière-Rumèbe, M., Tournaire, M.-P., 2013. Reproduction de l’huître creuse dans le Bassin d' Arcachon Année 2013. Ifremer 60.
- May, P., May, E., 1999. Rôles de P53 dans le cycle cellulaire, l’apoptose et le cancer. *Rev. Française des Lab.* 342, 41–48. doi:10.1016/S0338-9898(99)80035-3
- Meresse, M., Frostin, G., 2012. Quel avenir pour la filière ostréicole dans les régions de la façade atlantique française ? *Cons. Econ. sociaux environnementaux l’Atlantique* 54.
- Mermet-Bouvier, C., 2006. Caractérisation d’un nouveau récepteur à dépendance : TrkC et étude de la signification biologique de la fonction pro-apoptotique de RET dans la tumorigenèse.
- Mileikovsky, S. a., 1973. Speed of active movement of pelagic larvae of marine bottom invertebrates and their ability to regulate their vertical position. *Mar. Biol.* 23, 11–17. doi:10.1007/BF00394107
- Mille, D., Le Moine, O., 2011. Adaptabilités des activités conchylicoles aux modifications de leur environnement : Scénarii et solutions. La cas du bassin de Marennes-Oléron.
- Miossec, L., Deuff, R.-M. LE, Gouletquer, P., 2009. Alien species alert : *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). *ICES Coop. Res. Rep.* 46.
- Moal, J., Lambert, C., Moullac, G. Le, Moal, J., Lambert, C., Moullac, G. Le, 2010. Le facteur de risque température.
- Mori, K., 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 53, 361–369. doi:10.1007/BF00391619
- Mori, R., Wang, Q., Danenberg, K.D., Pinski, J.K., Danenberg, P. V., 2008. Both  $\beta$ -actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate* 68, 1555–1560. doi:10.1002/pros.20815
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Dubreule, C., Serpentine, A., Lebel, J.M., Costil, K., 2014. Effects of acute exposures to mecoprop, mecoprop-p and their biodegradation product (2-MCP) on the larval stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 146, 165–175. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.008



Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryo-larvaire de l’huître creuse Japonaise

- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpentine, A., Lebel, J.M., Jha, A.N., Costil, K., 2013. Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 128-129, 67–78. doi:10.1016/j.aquatox.2012.12.002
- Mottin, E., Caplat, C., Latire, T., Mottier, A., Mahaut, M.L., Costil, K., Barillier, D., Lebel, J.M., Serpentine, A., 2012. Effect of zinc sacrificial anode degradation on the defence system of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Chronic and acute exposures. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 1911–1920. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.06.017
- Muñoz, I., Rosés, N., 2000. Comparison of extraction methods for the determination of atrazine accumulation in freshwater molluscs (*Physa acuta* Drap. and *Ancylus fluviatilis* Müll, Gastropoda). *Water Res.* 34, 2846–2848. doi:10.1016/S0043-1354(99)00394-2
- Nadella, S.R., Fitzpatrick, J.L., Franklin, N., Bucking, C., Smith, S., Wood, C.M., 2009. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossolus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 340–348. doi:10.1016/j.cbpc.2008.09.001
- Neves, M., Castro, B.B., Vidal, T., Vieira, R., Marques, J.C., Coutinho, J. a. P., Gonçalves, F., Gonçalves, a. M.M., 2015. Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecol. Indic.* 53, 220–230. doi:10.1016/j.ecolind.2015.01.031
- Newton, a., Icely, J.D., Falcao, M., Nobre, a., Nunes, J.P., Ferreira, J.G., Vale, C., 2003. Evaluation of eutrophication in the Ria Formosa coastal lagoon, Portugal. *Cont. Shelf Res.* 23, 1945–1961. doi:10.1016/j.csr.2003.06.008
- O’Connell, P.J., Harms, C.T., Allen, J.R.F., 1998. Metolachlor, S-metolachlor and their role within sustainable weed-management. *Crop Prot.* 17, 207–212. doi:10.1016/S0261-2194(98)80011-2
- O’Connor, W.A., Lawler, N.F., 2004a. Salinity and temperature tolerance of embryos and juveniles of the pearl oyster, *Pinctada imbricata* Röding. *Aquaculture* 229, 493–506. doi:10.1016/S0044-8486(03)00400-9
- O’Connor, W.A., Lawler, N.F., 2004b. Salinity and temperature tolerance of embryos and juveniles of the pearl oyster, *Pinctada imbricata* Ro. *Aquaculture* 229, 493–506. doi:10.1016/S0044-8486(03)00400-9
- Of, S., Thesis, T.H.E., 2013. THESIS.
- Okamura, H., Aoyama, I., Liu, D., Maguire, R., Pacepavicius, G., Lau, Y., 2000. Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. *Water Res.* 34, 3523–3530.
- Orth, R.J., Carruthers, T.I.M.J.B., Dennison, W.C., Duarte, C.M., James, W., Jr, K.L.H., Hughes, A.R., Kendrick, G.A., Kenworthy, W.J., Olyarnik, S., Short, F.T., Waycott, M., Williams, S.L., 2006. Global Crisis for Seagrass Ecosystems - Done. *Bioscience* 56, 987–996.
- Ozoh, P.T., 1992. The effect of temperature and salinity on copper body- burden and copper toxicity to Hediste (Nereis) diversicolor. *Environ. Monit. Assess.* 21, 11–17.
- Park, M.S., Jo, P.G., Choi, Y.K., An, K.W., Choi, C.Y., 2009. Characterization and mRNA expression of Mn-SOD and physiological responses to stresses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol. Res.* 5, 451–461. doi:10.1080/17451000802626554
- Parker, L.M., Ross, P.M., O’Connor, W. a., 2010. Comparing the effect of elevated pCO<sub>2</sub> and temperature on the fertilization and early development of two species of oysters. *Mar. Biol.* 157,

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise

2435–2452. doi:10.1007/s00227-010-1508-3

- Peake, E., Locke, J., Tierney, L., Kolok, A., 2004. Copper tolerance in fatheadminnows: II. Maternal transfer. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 208–211.
- Perdue, J.A., Beattie, J.H., Chew, K.K., 1981. Some relationships between Gametogenic Cycle and Summer Mortality Phenomenon in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. *J. Shellfish Res.* 1, 9–16.
- Pernet, F., Barret, J., Le Gail, P., Malet, N., Pastoureaux, a, Munaron, D., De Lorgeril, J., Bachère, E., Vaquer, a, Huvet, a, Corporeau, C., Normand, J., Boudry, P., Moal, J., Quéré, C., Quilien, V., Daniel, J., Pépin, J., Saulnier, D., Gonzalez, J., Bouchouca, M., 2010. Mortalité du naissain d’Huître creuse *Crassostrea gigas* dans l’étang de Thau en 2009 96.
- Pernet, F., Barret, J., Le Gall, P., Franck, L., Fiandrino, A., Huvet, A., Corporeau, C., Boudry, P., Quéré, C., Dégremont, L., 2011. Mortalités massives de l’Huître creuse : causes et perspectives Rapport final du programme de recherche sur les mortalités d’ huîtres creuses *Crassostrea gigas* dans l’ étang de Thau.
- Pesando, D., Robert, S., Huitorel, P., Gutknecht, E., Pereira, L., Girard, J.P., Ciapa, B., 2004. Effects of methoxychlor, dieldrin and lindane on sea urchin fertilization and early development. *Aquat. Toxicol.* 66, 225–239. doi:10.1016/j.aquatox.2003.09.007
- Peyrefitte, M., 1993. La dynamique spatio-économique du Bassin d’Arcachon. IFREMER 1–10. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Piano, A., Asirelli, C., Caselli, F., Fabbri, E., 2002. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress Chaperones* 7, 250–257. doi:10.1379/1466-1268(2002)007<0250:HEITSO>2.0.CO;2
- Piquet, J.-C., 2014. DOCUMENT DE PRESCRIPTION « SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE » INVENTAIRE CARTOGRAPHIQUE DES POINTS DE PRELEVEMENT REMI ET DES LISTES DE ZONES CLASSEES ET SURVEILLEES 33.
- Plus, M., Dumas, F., Stanisière, J.-Y., Maurer, D., 2009. Hydrodynamic characterization of the Arcachon Bay, using model-derived descriptors. *Cont. Shelf Res.* 29, 1008–1013. doi:10.1016/j.csr.2008.12.016
- Plus, M., Maurer, D., Dumas, F., 2006. Caractérisation des composantes hydrodynamiques d’ une lagune mésotidale , le Bassin d’ Arcachon . PNEC – Chantier Littoral Atlantique : Mode de fonctionnement des systèmes semi-fermés du littoral Atlantique Thème 1 : Caractérisation des forçages hydrod. IFREMER 54.
- Pörtner, H.-O., Reipschlag, a, Heisler, N., 1998. Acid-base regulation, metabolism and energetics in *Sipunculus nudus* as a function of ambient carbon dioxide level. *J. Exp. Biol.* 201, 43–55.
- Pouvreau, S., Gangnery, A., Tiapari, J., Lagarde, F., Garnier, M., Bodoy, A., 2000. Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteriidae), cultivated in Takapoto atoll (French Polynesia). *Aquat. Living Resour.* 13, 37–48. doi:10.1016/S0990-7440(00)00135-2
- Pouvreau, S., Lepennec, M., 2006. Ecophysiologie de la reproduction chez l’huître creuse *Crassostrea gigas*.
- Przeslawski, R., Byrne, M., Mellin, C., 2015. A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. *Glob. Chang. Biol.* 21, 2122–2140. doi:10.1111/gcb.12833

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryo-larvaire de l’huître creuse Japonaise

- Quiniou, F., Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Geffard, a, Mouneyrac, C., Budzinski, H., Romeo, M., 2007. Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. *Env. Int* 33, 27–33. doi:S0160-4120(06)00097-3 [pii] 10.1016/j.envint.2006.06.020
- Quiniou, F., His, E., Delesmont, R., Caisey, X., 2005. Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux: bio-essai “développement embryo-lavaire de bivalve,” Méthodes d’analyse en milieu marin.
- Quiniou, F., Toularastel, F., LeFevre-Lehoerff, G., 1991. Utilisation des bioessais sur les embryons de bivalves dans le cadre d’une surveillance des effets biologiques. IFREMER 22.
- Ramachandran, S., Patel, T.R., Colbo, M.H., 1997. Effect of copper and cadmium on three Malaysian tropical estuarine invertebrate larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 36, 183–188. doi:10.1006/eesa.1996.1508
- Rao P. D.G.V and Khan M.A.Q, 2000. Zebra Mussels: Enhancement of Copper Toxicity by High Temperature and Its Relationship with Respiration and Metabolism. *Water Environment Research*.Vol. 72, No. 2, pp. 175-178
- Range, P., Pilo, D., Ben-Hamadou, R., Chicharo, M., Matias, D., Joaquim, S., Oliveira, A., Chicharo, L., 2012. Seawater acidification bu CO2 in a coastal lagoon environment: Effects on life history traits of juvenile mussels *Mytilus galloprovincialis*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 424, 89–98.
- Rice, C.P., Nochetto, C.B., Zara, P., 2002. Volatilization of Trifluralin, Atrazine, Metolachlor, Chlorpyrifos, -Endosulfan, and â-Endosulfan from Freshly Tilled Soil. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4009–4017.
- Richardson, B.J., Mak, E., De Luca-Abbott, S.B., Martin, M., McClellan, K., Lam, P.K.S., 2008. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels “integrate” biomarker responses? *Mar. Pollut. Bull.* 57, 503–514. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.02.032
- Ringwood, A.H., 1992. Comparative sensitivity of gametes and early developmental stages of a sea urchin species (*Echinometra mathaei*) and a bivalve species (*Isognomon californicum*) during metal exposures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 288–295. doi:10.1007/BF00212088
- Ringwood, A.H., Brouwer, M., 1995. Patterns of metallothionein expression in oyster embryos. *Mar. Environ. Res.* 39, 101–105. doi:10.1016/0141-1136(94)00042-N
- Rivard, L., 2003. Environmental Fate of Metolachlor. *Environ. Monit. Branch Dep. Pestic. Regul.* 14.
- Robert, R., His, E., 1981. Action de 1 1 acetate de tributyle -étain sur les oeufs et les larves D de deux mollusques d ’intérêt commercial : *Crassostrea gigas* (Thunberg ) et *Hytilus galloprovincialis* (Lmk). *Com. la Maric.* 42, 1–16.
- Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals 22.
- Rollin, C., Quiot, F., 2006. Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines, Rapport INERIS-DRC. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Ruesink, J.L., Hunter, S.L., Trimble, A.C., KimberlyW. Heiman, FiorenzaMicheli, J.E.B., Kay, and M.C., 2005. INTRODUCTION OF NON-NATIVE OYSTERS: Ecosystem Effects and Restoration Implications.
- Ruttikay-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R., 2013. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6044–6066. doi:10.3390/ijms14036044

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise

- Salvo, F., 2010. Approche comparée des populations naturelles et cultivées d’huître japonaise *Crassostrea gigas* dans une lagune macro-tidale (Bassin d’Arcachon) : cycle biologique, relations trophiques et effets sur le benthos 4, 510.
- Schroeder, H. a, Nason, a P., Tipton, I.H., Balassa, J.J., 1966. Essential trace metals in man: copper. J. Chronic Dis. 19, 1007–1034. doi:10.1016/0021-9681(70)90056-1
- Scourzic, T., Loyen, M., Fabre, E., Tessier, A., Dalias, N., Trut, G., Maurer, D., Simonnet, B., 2011. Evaluation du stock d’huîtres sauvages et en élevage dans le Bassin d’Arcachon.
- Shi, Y., 2002. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. Mol. Cell 9, 459–470. doi:10.1016/S1097-2765(02)00482-3
- Shine, J.P., Wallace, G.T., 1995. the Formation of Surface-Active Organic-Complexes of Copper in Coastal Marine Waters. Mar. Chem. 51, 145–157. doi:10.1016/0304-4203(95)00050-2
- SIBA, 2013. Rapport annuel 2013 sur le prix et la qualité des services publics de l’assainissement collectif et non collectif 112.
- Song, Y.P., Suquet, M., Quéau, I., Lebrun, L., 2009. Setting of a procedure for experimental fertilisation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. Aquaculture 287, 311–314. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.018
- Srinivasan, M., Swain, G.W., 2007. Managing the Use of Copper-Based Antifouling Paints. Environ. Manage. 39, 423–441. doi:10.1007/s00267-005-0030-8
- Suquet, M., Amourda, C., Mingant, C., Quéau, I., Lebrun, L., Brizard, R., 2007. Setting of a procedure for experimental incubation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. Aquaculture 273, 503–508. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.018
- Suquet, M., Mercier, A. Le, Rimond, F., Mingant, C., Haffray, P., Labbe, C., Iroise, T.B., 2012. Setting tools for the early assessment of the quality of thawed Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) D-larvae. Theriogenology 78, 462–467.
- Tagu, D., Moussard, C., 2003. Principes des techniques de biologie moléculaire, in: Principes Des Techniques de Biologie Moléculaire. p. 176.
- Tettlebach, S.T., Rhodes, E.W., 1981. Combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the Northern Bay scallop *Argopecten irradians irradians*. Mar. Biol. 63, 249–256.
- Thakkar, M., Randhawa, V., Wei, L., 2013. Comparative responses of two species of marine phytoplankton to metolachlor exposure. Aquat. Toxicol. 126, 198–206. doi:10.1016/j.aquatox.2012.10.002
- Thiyagarajan, V., Ko, G.W.K., 2012. Larval growth response of the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*) to multiple climate change stressors. Aquaculture 370-371, 90–95. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.09.025
- Thomas-Guyon, H., Gagnaire, B., Bado-Nilles, A., Bouilly, K., Lapègue, S., Renault, T., 2009. Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Dev. Comp. Immunol. 33, 653–659. doi:10.1016/j.dci.2008.11.011
- Trenkamp, S., Martin, W., Tietjen, K., 2004. Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty acid elongases from *Arabidopsis thaliana* by different herbicides. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 11903–11908. doi:10.1073/pnas.0404600101
- Turner, A., 2010. Marine pollution from antifouling paint particles. Mar. Pollut. Bull. 60, 159–171. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.12.004

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise

- Untersee, S., Pechenik, J.A., 2007. Local adaptation and maternal effects in twospecies of marine gastropod (*Crepidula*) that differ in dispersal potential. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 347, 79–85.
- Van der Werf, H.M.G., 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agric. Ecosyst. Environ.* 60, 81–96.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, 1–12. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Ventura-Lima, J., Sandrini, J.Z., Cravo, M.F., Piedras, F.R., Moraes, T.B., Fattorini, D., Notti, A., Regoli, F., Geracitano, L. a., Marins, L.F.F., Monserrat, J.M., 2007. Toxicological responses in *Laeonereis acuta* (annelida, polychaeta) after arsenic exposure. *Environ. Int.* 33, 559–564. doi:10.1016/j.envint.2006.09.016
- Verkhovskiy, M.I., Belevich, I., Bloch, D. a., Wikström, M., 2006. Elementary steps of proton translocation in the catalytic cycle of cytochrome oxidase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1757, 401–407. doi:10.1016/j.bbabi.2006.05.026
- Verween, a., Vincx, M., Degraer, S., 2007. The effect of temperature and salinity on the survival of *Mytilopsis leucophaeata* larvae (Mollusca, Bivalvia): The search for environmental limits. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 348, 111–120. doi:10.1016/j.jembe.2007.04.011
- Viarengo, A., Accomando, R., Ferrando, I., Beltrame, F., Fato, M., Marcenaro, G., 1996. Heavy metal effects on cytosolic free Ca<sup>2+</sup> level in the marine protozoan *Euplotes crassus* evaluated by confocal laser scanning microscopy. *Comp. Biochem. Physiol. C-Pharmacology Toxicol. Endocrinol.* 113, 161–168.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 146, 281–300. doi:10.1016/j.cbpc.2007.04.011
- Waddington, C., 1942. Canalisation of development and the inheritance of acquired characters. *Group* 563–565.
- Waeles, M., Riso, R.D., Cabon, J.Y., Maguer, J.F., L&apos;Helguen, S., 2009. Speciation of dissolved copper and cadmium in the Loire estuary and over the North Biscay continental shelf in spring. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84, 139–146. doi:10.1016/j.ecss.2009.06.011
- Ward, L.G., Kemp, W.M., Boyton, W.R., 1984. The influence of waves and seagrass communities on suspended particulates in an estuarine embayment. *Mar. Geol.* 59, 85–103. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Warner, K., Frankel, E., 1987. Effects of B-Carotene on light stability of soybean oil 64, 213–218.
- Watermann, B.T., Herlyn, M., Daehne, B., Bergmann, S., Meemken, M., Kolodzey, H., 2008. Pathology and mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in 2005 at the East Frisian coast, Germany. *J. Fish Dis.* 31, 621–630. doi:10.1111/j.1365-2761.2008.00953.x
- Waycott, M., Duarte, C.M., Carruthers, T.J.B., Orth, R.J., Dennison, W.C., Olyarnik, S., Calladine, A., Fourqurean, J.W., Heck, K.L., Hughes, Ar., Kendrick, G.A., Kenworthy, Wj., Short, F.T., Williams, S.L., 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 12377–12381. doi:10.1073/pnas.0905620106
- Weisshaar, H., Böger, P., 1987. Primary effects of chloroacetamides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 28, 286–293. doi:10.1016/0048-3575(87)90027-7

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise

- Weisshaar, H., Retzlaff, G., Ger, P.B., 1988. Chloroacetamide Inhibition of Fatty Acid Synthesis Chloroacetamides are an established preemergent herbicide class ; their mode of action , however , has still to be elucidated . Cell metabolism is generally disturbed , and the most pronounced effects are 216, 212–216.
- Weng, N., Wang, W., 2014a. Improved tolerance of metals in contaminated oyster larvae. *Aquat. Toxicol.* 146, 61–69. doi:10.1016/j.aquatox.2013.10.036
- Weng, N., Wang, W.X., 2014b. Improved tolerance of metals in contaminated oyster larvae. *Aquat. Toxicol.* 146, 61–69. doi:10.1016/j.aquatox.2013.10.036
- Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., Akcha, F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[alpha]pyrene, 17 alpha-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.* 85, 133–142. doi:DOI 10.1016/j.aquatox.2007.08.007
- Wisely, B., Blick, R., 1967. Mortality of marine invertebrate larvae in mercury, copper, and zinc solutions. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 18, 63 – 72.
- Wolins, N.E., Brasaemle, D.L., Bickel, P.E., 2006. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett.* 580, 5484–5491. doi:10.1016/j.febslet.2006.08.040
- Wu, S., Lin, H., Yang, W., 2008. The effects of maternal Cd on the metallo-thionein expression in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae. *Aquat. Toxicol.* 87, 296–302.
- Xu, D., Wen, Y., Wang, K., 2010. Effect of chiral differences of metolachlor and its (S)-isomer on their toxicity to earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1925–1931. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.07.035
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54. doi:10.1038/nature11413
- Zhang, Z., Xiaoxu, L., Vandeppeer, M., Zhao, W., 2006. Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256, 502–509.

### 3. Données complémentaires

Des analyses complémentaires ont été réalisées concernant les différents types de malformations larvaires observés sur les larves. Pour cela un dénombrement par catégorie de malformation a été effectué au cours des différents prélèvements de la campagne 2014, sur les deux sites d’études : Comprian ou Les jacquets, pour les larves issues des huîtres sauvages ou cultivées exposées aux différentes températures en présence ou non des polluants.

L’analyse des graphiques à secteur met en avant une diminution du nombre de larves D normales avec les changements de températures au profit de larves présentant des anomalies du manteau et plus particulièrement des hypertrophies avec expulsion quel que soit le site ou le mode de vie (Figures 43 à 46) mais aussi des arrêts de développement. En effet, de manière générale, plus la température diminue, plus le pourcentage d’arrêt de développement augmente. D’autre part, quand la température augmente, le pourcentage d’arrêt de développement augmente ainsi que le pourcentage de manteau rétracté. Ainsi, avec l’augmentation des températures, de plus en plus d’anomalies du manteau (hypertrophie avec expulsion et manteau rétracté) et d’arrêt de développement apparaissent en dépit des larves bien formées.

L’exposition à des concentrations de 1 et 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cuivre augmente le pourcentage d’hypertrophie avec expulsion d’autant plus que la concentration en cuivre est élevée (Figure 47). Le pourcentage d’échancrure augmente également. A 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , les embryons issus des huîtres cultivées n’ont pu se développer en larves D, 100 % d’arrêt de développement étant dénombrés. Au contraire, bien qu’une majorité d’arrêt de développement soient observées pour les larves issues des huîtres sauvages (83 et 65 % pour les huîtres des Jacquets et de Comprian respectivement) des hypertrophies avec expulsion peuvent être observées pour les huîtres sauvages de Comprian.

L’exposition à différentes concentrations en S-métolachlore augmente sensiblement le pourcentage d’arrêt de développement d’autant plus que la concentration est élevée (Figure 48). Le pourcentage d’échancrure augmente également.

Chapitre 4 – Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Japonaise

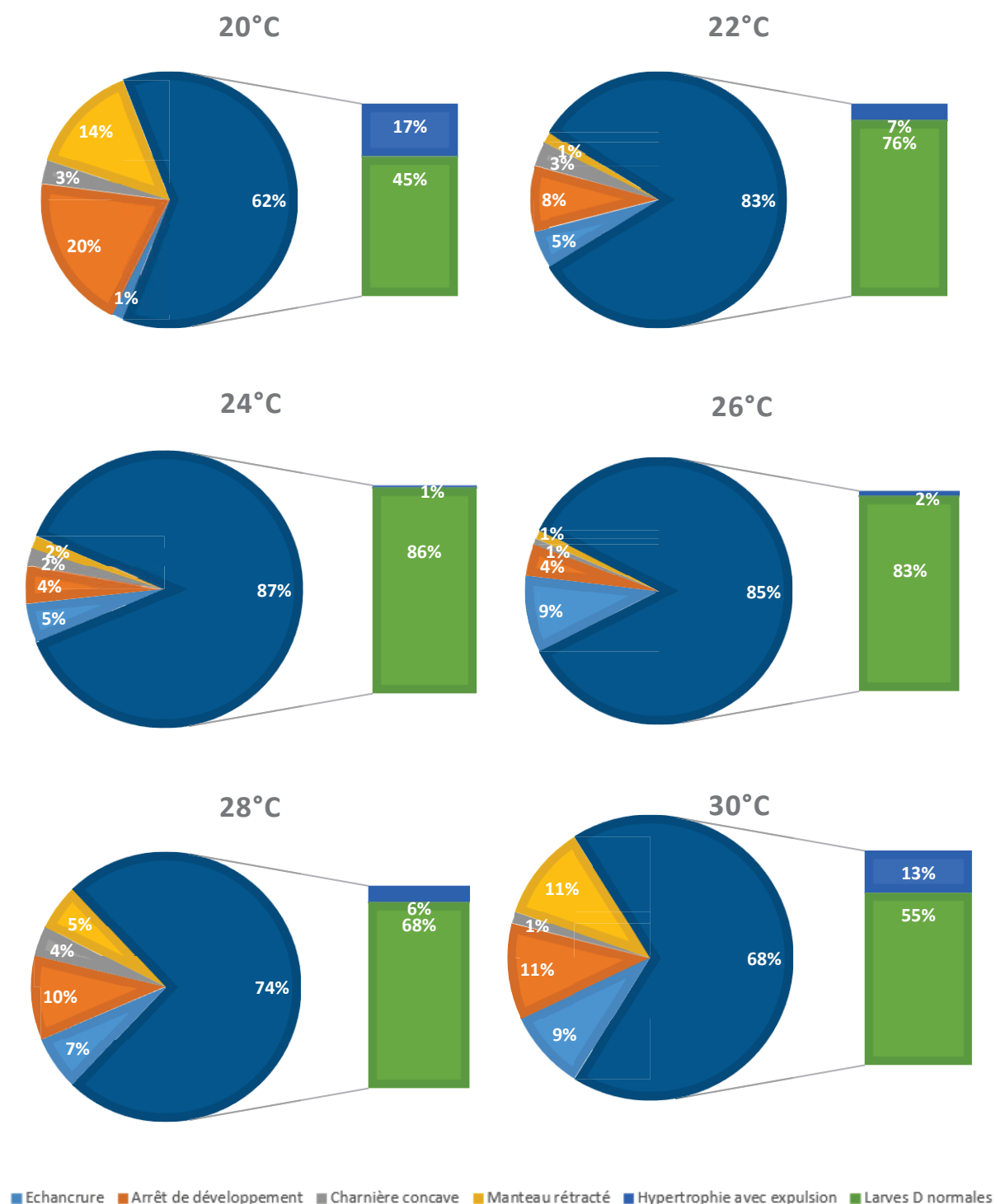


Figure 43 : Pourcentage de malformations larvaires en conditions contrôles après exposition à différentes températures, des embryons d'huîtres sauvages des Jacquets



Chapitre 4 – Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryonnaire-larvaire de l'huître creuse Japonaise

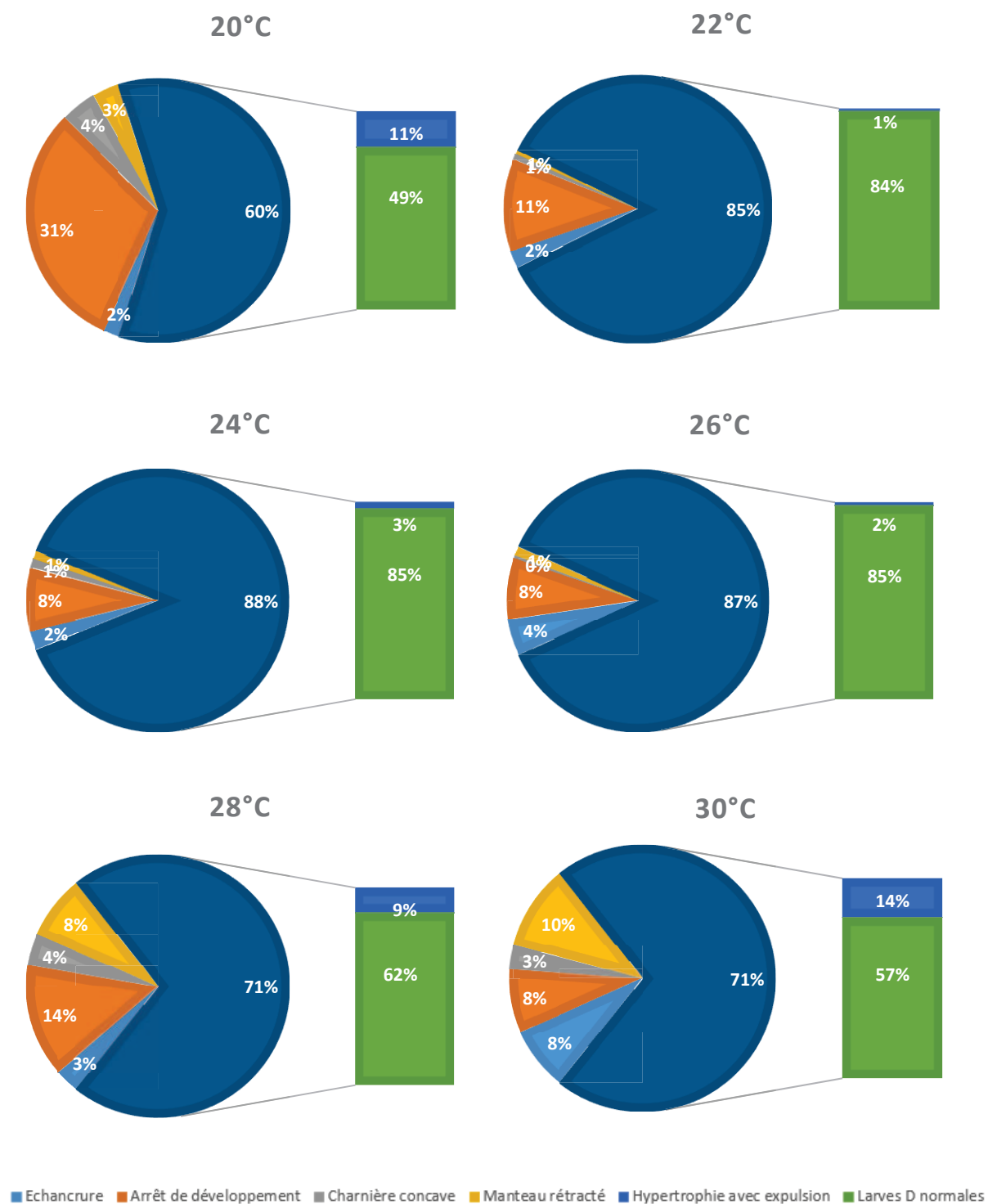


Figure 44 : Pourcentage de malformations larvaires en conditions contrôles après exposition à différentes températures des embryons d'huîtres sauvages de Comorian

Chapitre 4 – Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryolaire de l'huître creuse Japonaise

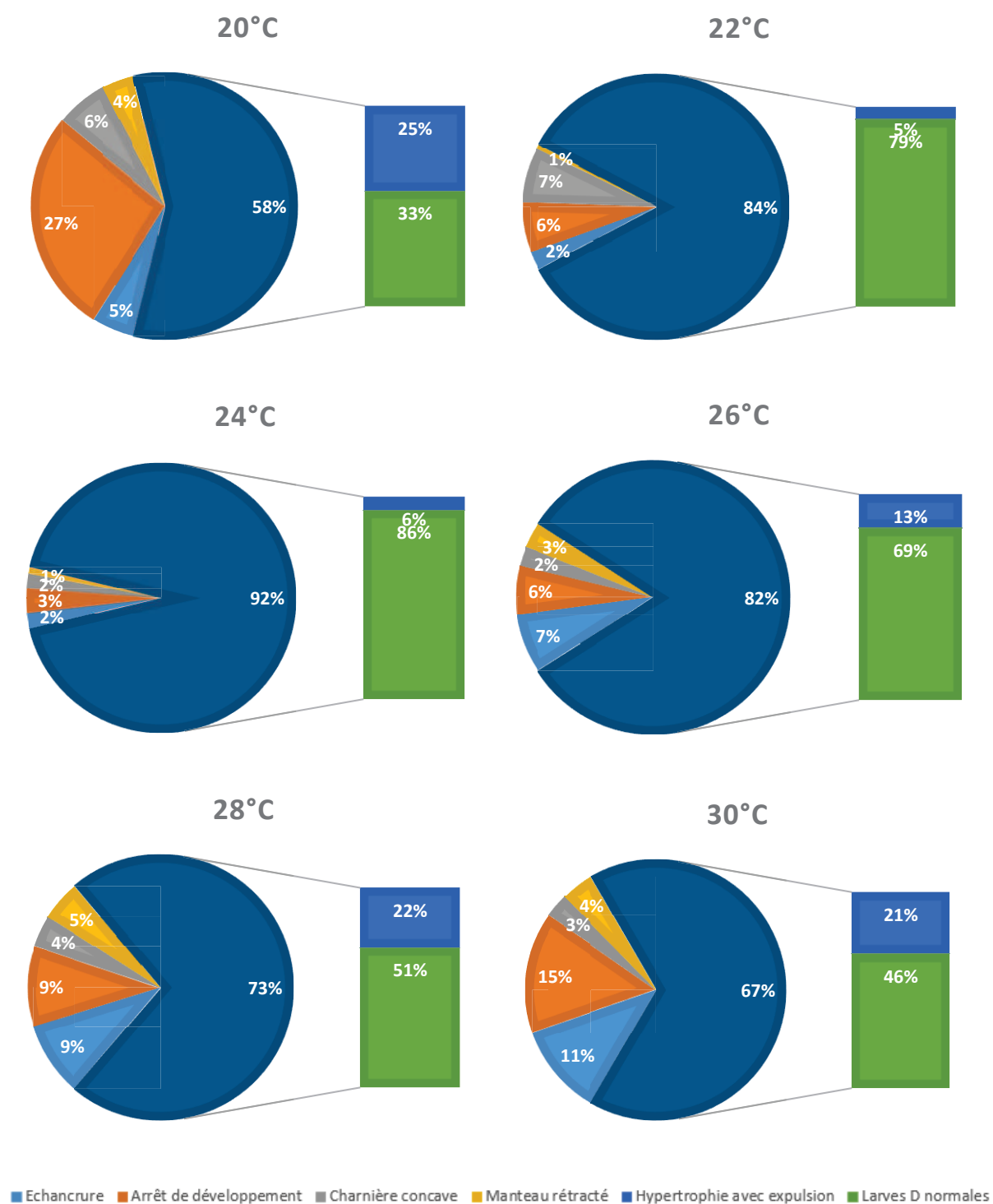


Figure 45 : Pourcentage de malformations larvaires en conditions contrôles après exposition à différentes températures des embryons d'huîtres cultivées des Jacquets

Chapitre 4 – Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryonnaire-larvaire de l'huître creuse Japonaise

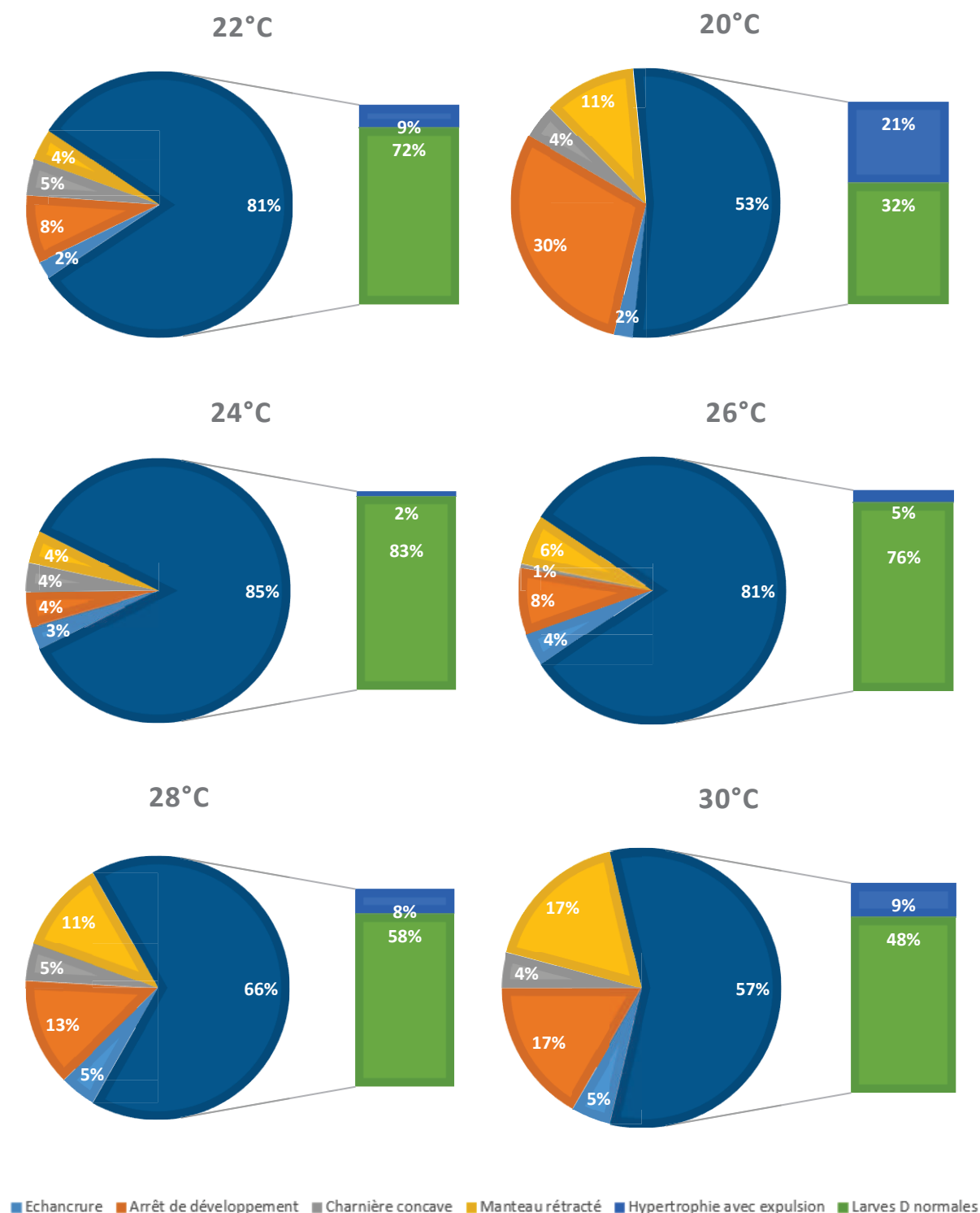


Figure 46 : Pourcentage de malformations larvaires en conditions contrôles après exposition à différentes températures des embryons d'huîtres cultivées de Comorian

Chapitre 4 – Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryo-larvaire de l’huître creuse Japonaise

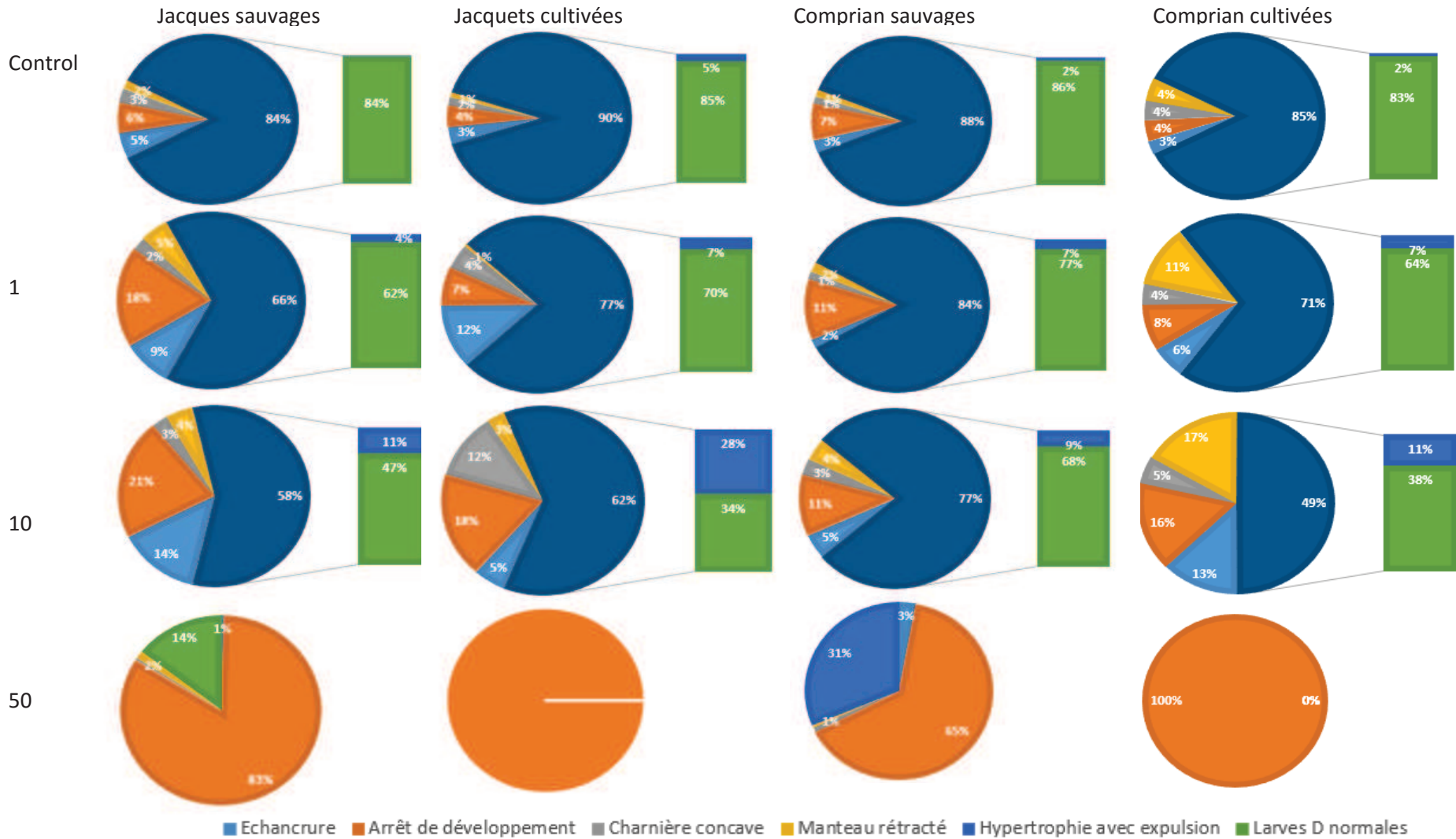


Figure 47 : Pourcentage des différentes malformations larvaires observées après exposition 24h à 24 °C au cuivre à différentes concentrations : A : 0 ; B : 1 µg.L<sup>-1</sup>, C : 10 µg.L<sup>-1</sup> et D : 50 µg.L<sup>-1</sup> pour des larves issues des huîtres cultivées ou sauvages des Jacques ou de Comprian

Chapitre 4 – Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryo-larvaire de l’huître creuse Japonaise

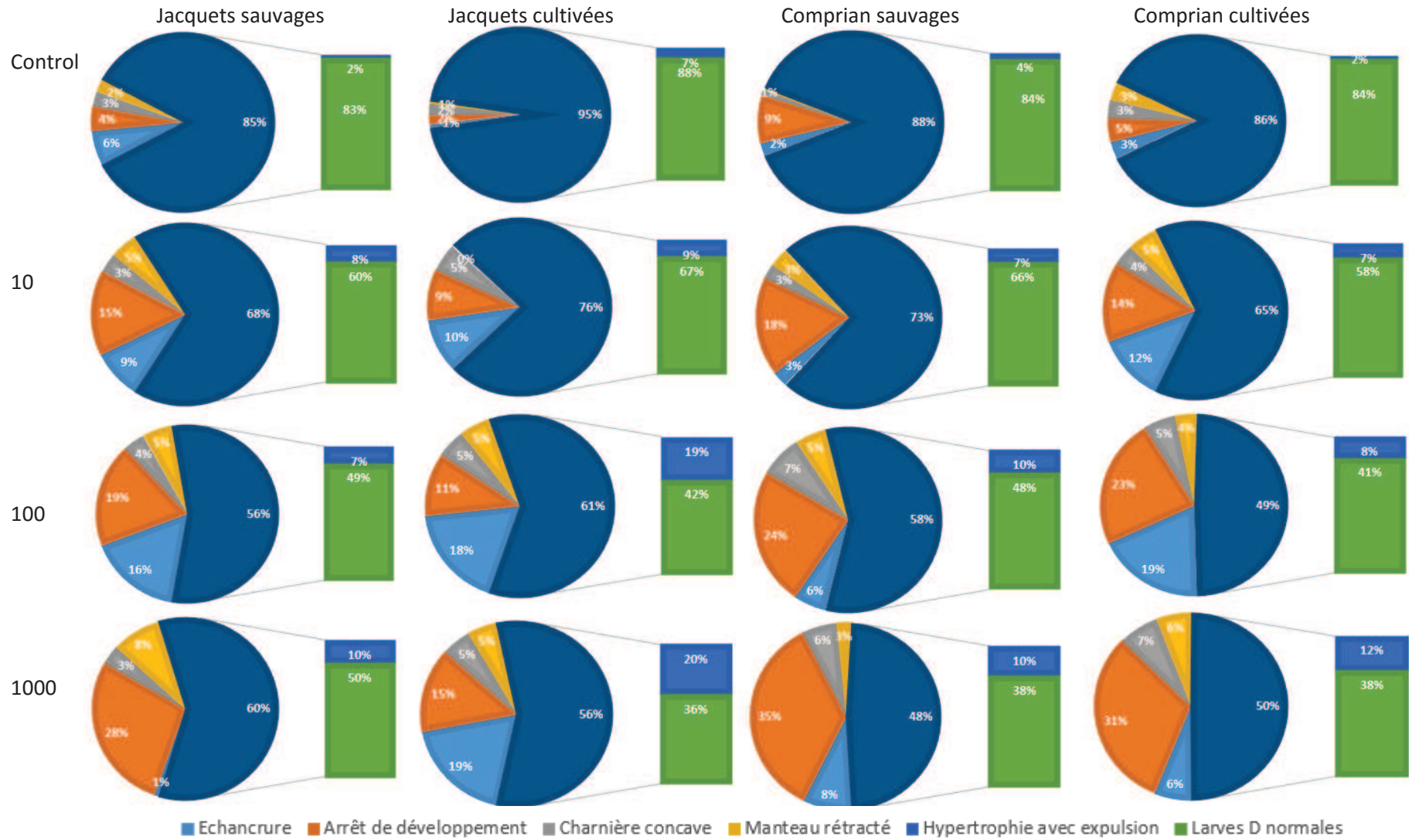


Figure 48 : Pourcentage des différentes malformations larvaires observées après exposition 24h à 24 °C au S-métolachlore à différentes concentrations : A : 0 ; B : 10 ng.L<sup>-1</sup>, C : 100 ng.L<sup>-1</sup> et D : 1000 ng.L<sup>-1</sup> pour des larves issues des huîtres cultivées ou sauvages des Jacquets ou de Comprian

### Discussion et conclusion

Le développement embryo-larvaire est un critère microscopique utilisé pour l'étude de nombreux invertébrés en écotoxicologie (Beiras and Albentosa, 2004; Calabrese et al., 1973; Chapman and Long, 1983; Connor, 1972; Fitzpatrick et al., 2008; Fujiya, 1970; His and Robert, 1982; Parker et al., 2010; Quiniou et al., 2007, 1991; Ramachandran et al., 1997; Ringwood, 1992; Suquet et al., 2012, 2007; Weng and Wang, 2014b). Cependant, les études embryo-toxiques dénombrant les malformations ne s'intéressent qu'au critère quantitatif, sans aborder le critère qualitatif, à savoir, la distinction entre les différentes malformations. Les résultats sont couramment explicités en pourcentage de malformations, toutes malformations confondues. Dans une précédente étude, nous avons déjà isolé le pourcentage d'arrêt de développement, considéré par la norme AFNOR comme une malformation larvaire. Cependant, cette anomalie correspond à un embryon ayant subi des problèmes de segmentation, et dont le développement n'a pu aboutir au stade de larve D (Gamain et al., 2016d). Une précédente étude a différencié les malformations en les classant par grande catégorie (larves présentant des malformations au niveau de la coquille ou des anomalies de charnière, larves montrant un manteau hypertrophié ; MASH : larves présentant une anomalie affectant à la fois la coquille, la charnière et le manteau) (Mottier et al., 2013). Dans la présente étude, une distinction de chacune des anomalies prises isolément a été effectuée. Il apparaît que des diminutions de températures entraînent une diminution du nombre de larves D normales pour laisser place au développement de larves présentant des hypertrophies avec expulsion ainsi que des arrêts de développement. Avec l'augmentation des températures, de plus en plus d'anomalies du manteau (hypertrophie avec expulsion et manteau rétracté) et d'arrêt de développement apparaissent en dépit des larves bien formées. L'exposition au cuivre augmente le pourcentage d'hypertrophie avec expulsion d'autant plus que la concentration en cuivre est élevée. Il apparaît clair que la malformation la plus sévère correspond aux arrêts de développement. En effet, à  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , les embryons issus des huîtres cultivées n'ont pu se développer en larves D, 100 % d'arrêt de développement étant dénombrés. Une étude antérieure évoquait déjà les arrêts de développement comme des atteintes beaucoup plus sévères que les anomalies de la coquille (Mottier et al., 2013). Dans la mesure où ces arrêts de développement empêche la formation de la larve D, il apparaît clair de qualifier cette malformation comme étant la plus dommageable. L'exposition à différentes concentrations en S-métolachlore augmente sensiblement le pourcentage d'arrêt de développement d'autant plus que la concentration est élevée. Le pourcentage d'échancrure augmente également. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus après exposition des embryons de l'huître creuse *C. gigas* à différentes concentrations en glyphosate,

Chapitre 4 –Effets combinés des changements de température, du cuivre et du S-métolachlore sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise

qui avait montré une augmentation prédominante des arrêts de développement et des anomalies de la coquille (Mottier et al., 2013).

La vulnérabilité des embryons et larves issus d'huîtres d'écloserie aux polluants cuivre et S-métolachlore, à la température et à la salinité a été évaluée dans les chapitres précédents. Cependant dans le milieu naturel, d'autres paramètres peuvent intervenir et influencer la réponse des embryons d'huîtres. Le chapitre suivant s'intéresse à ces différents paramètres en présence de concentrations environnementales en polluants.





---

Chapitre 5 - ANALYSE MULTIFACTORIELLE DE L'IMPACT  
DE LA POLLUTION DU BASSIN D'ARCACHON SUR LE  
DÉVELOPPEMENT EMBRYO-LARVAIRE DE L'HUÎTRE  
CREUSE JAPONAISE PRELEVÉE *IN SITU*

---

*Chapitre 5. Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée in situ*

L'autécologie est une science importante pour mieux cerner les exigences des espèces vis-à-vis des facteurs du milieu. La prise en compte de plusieurs facteurs explicatifs permet d'avoir une compréhension plus intimiste des subtiles relations entre un environnement et les organismes qui y vivent.

Dans le Bassin d'Arcachon, les larves d'huîtres proviennent des huîtres en élevage mais aussi du stock d'huîtres sauvages qui participe aussi à l'effort de reproduction. Ainsi, il est important de savoir si les huîtres adultes, de différents modes de vie, exposées au long terme à une pollution peuvent produire une descendance avec une meilleure tolérance au stress chimique.

Pour cela, des huîtres sauvages et cultivées ont été prélevées directement en différents points dans le milieu naturel. Le premier objectif est de déterminer l'influence du mode de vie, du lieu de fraies et de croissance des huîtres sur la sensibilité des embryons et larves d'huîtres face à la pollution. Le deuxième objectif est d'étudier la réponse génétique des larves issues de ces géniteurs. Pour compléter cette étude, la capacité de fécondation des gamètes exposés à des polluants modèles à des concentrations représentatives du milieu a été suivie. L'état de maturation des géniteurs avant ou pendant la période de reproduction a été réalisée avec des coupes histologiques de gonades.

### **1. Article 3 : Effets des paramètres spatiaux ou du mode de vie des géniteurs d'huître, *Crassostrea gigas* originaire du Bassin d'Arcachon sur la sensibilité de leur descendance aux polluants**

Jusqu'à présent, très peu d'études écotoxicologiques ont été réalisées en utilisant des huîtres adultes provenant directement du Bassin d'Arcachon (Geffard, 2001; His et al., 1989a). Par ailleurs, la comparaison des deux populations d'huîtres, sauvages et cultivées présentes sur les mêmes sites du Bassin, n'a jamais été entreprise, alors que toutes deux contribuent à la production de larves. L'objectif est d'étudier si les conditions de vie des géniteurs peuvent entraîner des différences de réponses dans la descendance notamment quant à la formation de larves D normalement formées ou non. Pour cela, deux campagnes de prélèvement ont eu lieu en période de reproduction en 2013 et 2014 en différents points du Bassin (Grand Banc et Le Tès en 2013 ; Les Jacquets et Comprian en 2014). L'objectif de ces prélèvements était d'étudier la variabilité du pourcentage de malformations larvaires en fonction des paramètres temporels et spatiaux. Ces expériences étant menées aussi bien sur des huîtres adultes cultivées que sur des huîtres adultes sauvages, l'effet de ce que nous avons appelé le « mode de vie » sur la variabilité du pourcentage de malformations larvaires a également été étudié. Les géniteurs prélevés dans le milieu ont été utilisés au laboratoire pour réaliser le test embryon-larvaire en exposant ou non les embryons à des concentrations environnementales en cuivre ( $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) ou en S-métolachlore ( $10 \text{ ng.L}^{-1}$ ). La bioaccumulation de cuivre, et dans une moindre mesure, du S-métolachlore, a été observée dans les huîtres du bassin d'Arcachon. Une tendance temporelle a été observée avec des niveaux plus élevés en 2014 en comparaison de 2013. De plus, les huîtres cultivées bioaccumulent plus de cuivre que les huîtres sauvages. Les résultats ont permis de montrer que des concentrations environnementales en cuivre ou S-métolachlore peuvent induire des anomalies du développement dans la descendance des populations sauvages et cultivées des huîtres du bassin d'Arcachon. Les paramètres modes de vie, date et site de prélèvement des géniteurs ne sont pas corrélés à la sensibilité des embryons. Ces résultats ont également permis de constater que les huîtres d'écloserie répondent aux polluants de la même façon que les huîtres autochtones bien qu'une sensibilité supérieure ait été constatée.

**Do temporal and spatial parameters or lifestyle of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* broodstock native from the Arcachon Bay (Southwest coast of France) affect pollutant bioaccumulation, offspring development and tolerance to pollutants?**

Perrine Gamain, Jérôme Cachot, Patrice Gonzalez, Pierre Yves Gourves, Hélène Budzinski, Bénédicte Morin

Univ. Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

**ABSTRACT**

This study evaluated the effect of environmental concentration of copper ( $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) and S-metolachlor ( $10 \text{ ng.L}^{-1}$ ) on the early life stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, native from the Arcachon Bay (SW, France). Abnormal D-larvae, from wild and cultivated oysters, were investigated for 2 years (2013 and 2014) during breeding season at different sampling sites and dates. Copper and metolachlor concentrations were determined both in seawater and in mature oysters. Bioaccumulation of Cu was observed at higher level in wild than in farmed specimens. Metolachlor was accumulated at much lower levels. After 24 h exposure, significant increases of the percentage of abnormal D-larvae were observed at  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  of copper or  $10 \text{ ng.L}^{-1}$  of metolachlor in comparison with the controls in all studied conditions. The current study demonstrated that environmental concentrations of copper, and metolachlor can induce developmental abnormalities in farmed and wild populations of oysters. However larval abnormalities were not significantly related to temporal, spatial parameters and lifestyle of genitors.

**Key words:** Metolachlor, copper, Pacific oyster, embryotoxicity bioassay, bioaccumulation

## 1. Introduction

Bivalve molluscs such as oysters, mussels and clams contribute significantly to world aquaculture and the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) is ranked number one in terms of world aquaculture production with 555 913 tons estimated in 2013 (FAO, 2015). The Bay of Arcachon is an area of high ecological productivity, linked to various socioeconomic activities (oyster-farming, fishing, boating leisure, etc.). Regarding oyster farming, the total production of marketable oysters reaches 7,000 tons and represents 6.92 % of French production in 2012 (CNC, 2012). In this lagoon, oysters grown either by off-bottom oyster farming that is the breeding of oysters in bags on trestles that are held above the seafloor (cultivated oysters) or by traditional on-bottom production from oyster reefs on Arcachon bay foreshores (wild oysters). To date no study has been conducted to compare the sensitivity of wild and farmed populations while they both contribute to the larvae production in the bay. Since 1998, several years have been particularly unfavorable for oyster larval recruitment and high mortality of oyster spat have been recorded. In many countries worldwide, the occurrence of significant mass mortalities in both adult and juvenile *C. gigas* populations has been reported, generally during the summer months (Cotter et al., 2010a; Mori, 1979; Perdue et al., 1981; Pernet et al., 2011, 2010; Watermann et al., 2008). Although the mass mortality phenomenon encountered in recent years is often associated with infectious agents, it is also often related to environmental changes and highlights the delicate balance that governs an ecosystem. Coastal ecosystems, such as Arcachon Bay, are under constant increase in anthropic pressure. The quality of coastal waters has been particularly deteriorated in recent years as the population and human activities have increased (Newton et al., 2003). These areas have become over the years the recipient of many contaminants generated by human activities and are exposed to a wide variety of natural and anthropogenic stressors (Adams, 2005). Thus, exposure to pollutants could partly account for the reduction in early life stages of oysters and adult mortalities and could explain some of the causes of the different oyster farm crisis. Among the several pollutants that can contribute to aquatic pollution, pesticides have been widely recorded in waters and sediments from various estuaries, coastal areas and lakes and other surface waters that support aquatic life (Gilliom, 2007). For instance, the pesticide contamination in Arcachon bay is widely dominated by the metolachlor at around 10 ng.L<sup>-1</sup> and its metabolites (Auby et al., 2007; Budzinski et al., 2011). In fact, Arcachon bay is indeed the final recipient of several rivers draining a watershed of 4138 km<sup>2</sup> (Auby and Maurer, 2014) mainly dominated by agriculture and urban areas. Moreover, copper (Cu) is among the most dangerous metal for bivalve larvae (His et al., 1999). Throughout the world, Cu is used in antifouling paint (Turner, 2010). The Cu mean concentration in seawater of the French Atlantic coast was 0.7 µg.L<sup>-1</sup> at the early 2000 (Geffard et al., 2002). The most recent data in the Arcachon bay show

concentration  $< 1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Gamain et al., 2016d; Mai et al., 2012). In oysters, copper bioaccumulation measurements were performed since 1983 in the bay. Results show an increase from around 100  $\text{mg.kg}^{-1}$  dry weight in 1983 to around 400  $\text{mg.kg}^{-1}$  dry weight in 2015 (ROCCH, 2015). We have previously demonstrated that D-larvae, obtained from parents of hatchery oysters, exposed to environmental doses of copper or metolachlor show abnormal development (Gamain et al., 2016d; Mai et al., 2013, 2012). Our objectives therefore were two-fold (1) to determine if the temporal, spatial parameters or lifestyle of the broodstock oyster of the Arcachon Bay affects the sensitivity of the D-larvae to pollutants (2) to assess if fertilized eggs from adult oysters from the Arcachon Bay which have been living all their life in a slightly contaminated area, were more able to stand toxic effects of copper and metolachlor at environmental concentration of Arcachon than those from hatchery.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and seawater

Reference toxicants ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , and S-metolachlor) and formalin were purchased from Sigma–Aldrich Chemical (St. Quentin Fallavier, France). For experiments with oysters hatchery, seawater was collected in the Arcachon Bay (SW France) near the Banc d'Arguin which is a location diluted by ocean contribution. For experiments with oysters from the Arcachon bay, water was collected to the nearest site of the opening of the ocean (Grand Banc or Arguin in 2013 or 2014 respectively). Immediately after sampling, seawater was filtered using membrane filter of 0.45  $\mu\text{m}$  and then 0.2  $\mu\text{m}$  (Xilab) to eliminate debris and microorganisms. Filtered seawater (FSW) was stocked at 4 °C in the dark and was used within 3 days. A few hours before experiment, FSW was filtered again at 0.2  $\mu\text{m}$ . This reference water was chemically analyzed for pollutant concentration determination.

### 2.2. Animals

Adult wild and cultivated oysters (*C. gigas*, Thunberg, 1793) were collected during the natural reproduction period from four different sites in the Arcachon Bay: Le Tès and Grand Banc in summer 2013, Comprian and Les Jacquets in summer 2014 (Fig.1). Individuals of three years were collected for cultivated oysters. For wild oysters, individuals of equivalent size to cultivated oysters were collected ( $90.8 \text{ mm} \pm 14.1$  of length;  $48.4 \text{ mm} \pm 5.7$  of width). Animals were brought back to the laboratory in tanks filled with seawater site and were kept overnight in this water aerated by an air bubbling at a regulated temperature of 12 °C.

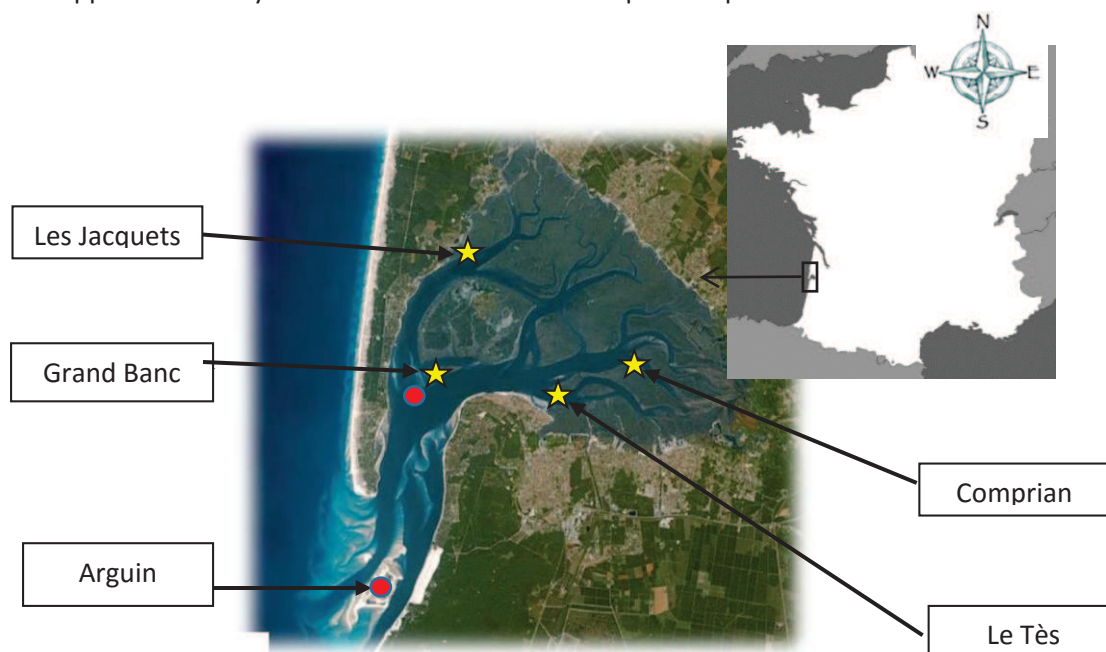


Figure 1: Sampling site for mature oysters (stars) and water (ring) in the Arcachon Bay (SW France)

Oysters hatchery came from a commercial hatchery specialized in the year-round production of mature oysters (Guernsey Sea Farms, UK). Oysters were kept at around 10 °C for transportation and then acclimatized in FSW before the beginning of experiments. All oysters were used immediately.

### 2.3. Preparation of metal and pesticide solutions

The range of experimental concentrations was chosen on the basis of preliminary studies (Mai et al., 2014, 2012). The metal and pesticide solutions were made up from analytical grade copper sulfate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) and S-metolachlor. Working solutions were obtained diluting the stock solutions (100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for copper and 250  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for metolachlor) in FSW (collected at one site for each sampling date) and were chemically analyzed. Environmental concentrations in the Arcachon bay were selected for test concentrations of copper (1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and S-metolachlor (10  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

### 2.4. Chemical analysis

#### 2.4.1. Reference sea water and contamination solutions

The working solutions were chemically analyzed for pollutant concentration confirmation. For chemical analysis of metals, three replicats of about 10 mL of each sample (stock solutions and FSW) was acidified with 5% final of nitric acid (Nitric acid 65%, Fluka). Samples were then analysed by Inductively-Coupled Plasma Optic Emission Spectrometry (ICP-OES 720, Agilent Technologies, Arcachon, France). The validity of the method was periodically checked with Tort-2 and Dolt-4 certified materials (lobster hepatopancreas and dogfish liver from NRCC-CNRC, Ottawa, Canada) and values obtained were within the certified ranges. Quantification limit was 0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .



Metolachlor level was determined by liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass spectrometer and performed using a HPLC/MS/MS system from Agilent Technologies company (HPLC 1290 system coupled to 6460 mass spectrometer) (mobile phase: water (5 mM ammonium acetate + 0.1% acetic acid)/methanol (100%/0% to 0%/100% within 17 min at 0.5 mL/min); column: Kinetex C18 100 mm (length), 2.1 mm (internal diameter), 1.7 mm (porosity) ; ionization mode: ESI +). One mL of each individual solution was mixed with 50  $\mu$ L of mixture of internal standards (metolachlor d6) in methanol (nominal concentrations 10 ng.L<sup>-1</sup>) and were directly analyzed. Procedural blanks (three blanks between each sample) were performed to ensure the absence of laboratory-contamination. Moreover, it ensures optimal cleaning of the chromatographic system between each sample and allows to achieve detection limits as low as possible while avoiding cross-contamination. Metolachlor was quantified using a quantification transition. Its presence is attested through a transition confirmation but also thanks to the relationship between abundance and the quantification of transition. Recovery and reproducibility were determined using spiked water samples (at nominal concentration of 10 ng.L<sup>-1</sup>) processed at the same time as the samples to be characterized. Detection and quantification limits were respectively of 0.6 and 1.9 ng.L<sup>-1</sup>.

#### 2.4.2. Oysters

For the determination of pollutant body burden, ten organisms were extracted carefully, drained on absorbent paper, and then ground at 8000 rounds.min<sup>-1</sup> and 9500 rounds.min<sup>-1</sup> (Ultra Turrax T2S, Janke and Kunkel, IKA Labortechnik). The homogenate obtained was distributed in four polypropylene tubes: two used for the analysis of organic contaminants and two used for the analysis of metal contaminants. These tubes were then frozen at -20 ° C waiting analysis.

Before metal concentration analysis, ground oyster samples were thawed and incubated 48 h at 45 ° C to remove water. In this way, the results are expressed relative to the dry mass, which allows to overcome all variations. The lyophilized samples of oysters tissues were first digested in 3 mL of pure HNO<sub>3</sub> in a pressurized medium at 100 °C for 3h (hot block CAL 3300, Environmental Express, USA). Samples were then diluted up to 18 mL with ultra-pure water (Milli-Q, Bedford, MA, USA). Cu content was then measured by Inductively-Coupled Plasma Optic Emission Spectrometry (ICP-OES 720, Agilent Technologies) on 3 replicats per samples. Metal concentrations in dry tissues were expressed in mg/kg DW. For Cu, the validity of the method was periodically checked with Tort-2 and Dolt-4 certified materials (lobster hepatopancreas and dogfish liver from NRCC-CNRC, Ottawa, Canada) and values obtained were within the certified ranges. The limits of detection for Cu was 0.5 mg.kg<sup>-1</sup>.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

Before pesticide analysis, samples were thawed and weighed to obtain fresh weight. Samples from the same site and same lifestyle (wild / cultivated) from the different sampling date were pooled in 2013 and 2014. The samples are then refrozen and then lyophilized and weighed to obtain the dry weight. The following different compounds were analyzed in oyster extracts collected during the two campaigns in 2013 and 2014 : 1-(2,4-Dichlorophenyl)urea, 1-(3,4-Dichlorophenyl)urea, 1-(3,4-Dichlorophenyl)-3-methyl urea, acetochlor , acetochlor ESA, acetochlor OA, alachlor , amethryn, atrazine, atrazine 2 hydroxy, azoxystrobine, bentazone, carbendazime , carbetamide, carbofuran, carbosulfan , chlorotoluron, chloresulfuron, cyanazine , cyromazine, deséthylatrazine, atrazine desisopropyl , diflufenican, dimetachlor, diuron, DMSA, DMST, flazasulfuron, fluazifop-p-butyl , flusilazole , hexazinone, hydroxy simazine , imidacloprid, irgarol , isoproturon, linuron, metazachlor, methiocarb, metolachlor, metolachlor ESA , metolachlor OA , metoxuron, metsulfuron-methyl , nicosulfuron, promethryn , propachlor propazine, propiconazole, prosulfuron, pymethroline , quizalofop-ethyl , quizalofop-ethyl , simazine, terbutryn, terbutylazine , terbutylazine desethyl , thiamethoxan. These compounds are representative of those commonly found in the waters of the Bay of Arcachon. They were analyzed by LC / MS / MS using an MRM method in peak to peak, associated with a solid phase extraction protocol SPE (Solid Phase Extraction). 0,5 g of the studied matrix oysters were spiked with an internal standard (alachlor d13, atrazine 2 hydroxy d5, atrazine d5, bentazone d7, carbendazime d3, carbetamide d5, carbofuran d3 , chlorotoluron d6 , DEA-d7 , DIA d5, diuron d6 , hexazinone d6 , imidacloprid d4, irgarol d9, isoproturon D6, linuron d6 , métolachlore d6, metoxuron d6, metoxuron d6, metsulfuron-methyl d3, nicosulfuron d6, promethryn d14, Propazine D14, Propazine D14, quizalofop-ethyl d3, quizalofop-ethyl d3, simazine d10, terbutryn D5, terbutylazine d5, terbutylazine desethyl d9, thiamethoxan d3) according to the presumed contamination of the matrix.

50  $\mu\text{L}$  of a solution containing  $63.3 \text{ ng.g}^{-1}$  were introduced into the samples. A triplicate of the first sample of the series was made in order to overcome the variability of the manipulator. To test the efficiency of the extraction, supplemented sample was used. This is the case of oyster ground material from a sampling of October 2011 at the "Banc d'Arguin". In this sample, 50  $\mu\text{L}$  of the internal standard were introduced and 50  $\mu\text{L}$  of a native solution at a concentration of  $63.3 \text{ ng.g}^{-1}$ . In all these samples, a solvent mixture (methanol) and water acidified at pH 2 is added in the proportion of 12mL. A blank protocol containing only solvent (methanol and water at pH 2) allows us to characterize the contamination that could be recovered in the machine. All samples prepared by microwave extraction using the mixture methanol / water 50/50 v / v. Once completed, a solid phase extraction was performed. The samples were rinsed with methanol. The remaining solvent was removed using the

RapidVap Labconco at a temperature of 60 °C, at a speed of 80 speed and a pressure of 700 mbar for 60 min. For the campaign of summer 2014, solvent evaporation was performed in nitrogen flow. Once evaporated, extracts were finally purified by SPE. SPE cartridges used for the extraction (Oasis® HLB 3cc, 60 mg) were successively conditioned with 3 mL of methanol and 3 mL of acidified water at pH 2 (HCl). The passage of liquid through the cartridges was facilitated by applying a vacuum. The sample was then percolated and the analytes were then retained on the receptor phase. The analytes and internal standards were then eluted from the adsorbent with 3 mL of methanol. The eluates recovered in vials were evaporated under nitrogen flux to be transferred into injection vials restrictor 300 µL. The limits of detection and quantification were calculated with reports on signal noise above 3 or 9, respectively (Annex 1).

### 2.5 Embryotoxicity assay

Gametes were obtained by stripping the gonad. Eggs and sperm from two individuals were selected to give a single pairing. Sperms and eggs were sieved separately through a 50 µm and 100 µm meshes (Sefar Nitex), respectively to eliminate debris and feces. Sperm mobility was checked and eggs were counted under the microscope (LEICA DME) at a magnification of 100. Eggs were fertilized with sperm at ratio of 1:10 (egg:sperm) homogenizing with an agitator to prevent polyspermy. Fertilization success was checked under microscope, and embryos were then counted and transferred to 24-well microplates (Greiner Bio-One, Cellstar) for embryotoxicity assays. The embryotoxicity assay has been described in details by His et al. (1999) and Quiniou et al. (2007) and more recently by Mai et al. (2012). Fertilized eggs (around 500) were exposed in wells containing 2 ml of toxicant solution. These microplates were incubated at 24 °C for 24 h in the dark. After incubation, 25 µl of 37% buffered formalin were added per well and the percentage of abnormal oyster larvae was then recorded. Hundred individuals per well were directly observed under inverted microscope (Nikon eclipse) to determine the number of abnormal D-shell larvae according to the criteria described in His et al. (1999) and Quiniou et al. (2007). An important prerequisite to validate the test was the presence, in control condition (24 °C in the absence of contamination) of less than 20 % of larval abnormalities. In this experimentation, various numbers of couples were used (table 1) and hence four replicates were performed for each couple.

Table 1: Number of couples used for each study condition

Date	Condition	Number of couples
Summer 2013	Le Tès cultivated	5
	Le Tès wild	2
	Grand Banc cultivated	2
Summer 2014	Comprian wild	2
	Les Jaquets wild	6
	Comprian cultivated	5
	Les Jaquets cultivated	1
	Hatchery	4

## 2.6 Statistical analysis

All data is expressed as means  $\pm$  standard error (S.E.). Data were first transformed using the following formula:  $p' = \arcsin \sqrt{p}$  where  $p$  is the percentage of abnormalities, specified in  $p$  values from 0 to 1 (Legendre and Legendre, 1998). Homogeneity of variance (Levene's test) was verified and then statistical comparisons were performed by the Kruskal-Wallis tests. Differences among tested concentration means were then performed using Kruskal post hoc test. Significance difference was accepted when  $p < 0.05$ . For correlation matrix, the XLStat logiciel was used. Correlation was confirmed for a  $p$ -value  $< 0.001$  or  $< 0.05$ . The relative dispersion measure was calculated using the coefficient of variation (Aerts et al., 2015):

$$CV = \frac{\sigma}{\mu}$$

where  $\sigma$  is average of the values and  $\mu$  the standard deviation.

## 3. Results

### 3.1 Chemical analysis of tested pollutant solution

Table 2 shows Cu and metolachlor concentrations determined in the control condition and in the contamination solutions in 2013 and 2014. The reference seawaters used in experiments at different sampling dates are represented in bold. Analyses revealed the presence of copper in reference seawaters at concentrations  $\leq 3.5 \mu\text{g.L}^{-1}$  in 2013 and  $\leq 2 \mu\text{g.L}^{-1}$  in 2014. For sea water spiked with Cu at  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ , the measured Cu concentrations varied from 3.8 to  $4.2 \mu\text{g.L}^{-1}$  and from 2.1 to  $3.8 \mu\text{g.L}^{-1}$  in 2013 and 2014 respectively. Analyses also revealed the presence of metolachlor in reference seawater at very low concentrations in 2014 ( $4.3 \pm 1.3 \text{ ng.L}^{-1}$ ). In 2013, higher metolachlor concentrations were measured ( $17.8 \pm 8.5 \text{ ng.L}^{-1}$ ). Moreover, higher variability was observed between sampling dates and sites in 2013 compare to 2014. For instance, the highest metolachlor concentration was found for the date 7/10/13 with 30 and  $27 \text{ ng.L}^{-1}$  for Le Tès and Grand Banc respectively (data not shown). At

nominal concentrations of 10 ng.L<sup>-1</sup>, the measured concentrations varied between 14 and 44 ng.L<sup>-1</sup> depending on the background levels of the reference FSW.

Table 2: Copper ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) and metolachlor (ng.L<sup>-1</sup>) concentrations determined in the reference seawater and in contamination solutions during summer 2013 and 2014

		Copper				Metolachlor			
		Sea Water			Spiked SW at 1 $\mu\text{g/L}$	Sea Water			Spiked SW at 10 ng/L
		Mean	Min	Max	Mean	Mean	Min	Max	Mean
2013	Le Tès	3.2 ± 0.4	2.9	3.7		15.5 ± 12.9	6.4	30	
	Grand Banc	<b>3.5 ± 0.5</b>	3.1	4	4.2 ± 0.4	<b>17.8 ± 8.5</b>	10.2	26.9	30.3 ± 11.4
2014	Comprian	1 ± 0.2	0.8	1.2		4.3 ± 0.7	3.3	5.1	
	Les Jacquets	0.9 ± 0.3	0.6	1.3		3.4 ± 1.6	2.1	5.8	
	Arguin	<b>2 ± 1</b>	0.6	3	3.3 ± 0.7	<b>4.3 ± 1.3</b>	3.5	6.9	18 ± 5.3

Analysis of reference seawater from the Banc d'Arguin used for oysters hatchery experiments revealed the presence of copper at concentrations of  $0.9 \pm 0.3 \mu\text{g.L}^{-1}$ . For the  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  spiked seawater, the measured concentration reached  $1.9 \pm 1.4 \mu\text{g.L}^{-1}$  which is higher than expected since it also included the Cu initially present in the reference seawater.

Background metolachlor levels measured in the reference seawater used for the oysters hatchery experiments was in average  $2 \pm 0.6 \text{ ng.L}^{-1}$  confirming the low contamination of reference seawater. For the  $10 \text{ ng.L}^{-1}$  spiked water, measured metolachlor concentration was  $14 \pm 3.1 \text{ ng.L}^{-1}$  in agreement with the expected value.

### 3.2 Bioaccumulation

#### 3.2.1. Copper bioaccumulation

In 2013, wild oysters collected at "Le Tès" have bioaccumulated significantly more copper than oysters collected at "Grand Banc". Moreover, cultivated oysters from "Le Tès" have bioaccumulated less Cu with an average of  $110.8 \pm 5.9 \text{ mg.kg}^{-1}$  than wild oysters with an average of  $161.9 \pm 19 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Fig. 2)

In 2014, oysters have bioaccumulated significantly more Cu than oysters sampled in 2013 whatever the studied conditions but the variability between samples is high (Fig. 2 and 3). Generally, higher Cu bioaccumulation was observed in wild oysters (median of  $325.7 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) compared to cultivated oysters (median of  $245.7 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) for the two study sites (Fig. 2), with one exception for cultivated oysters from Comprian the 07/15/14 that reach the highest Cu concentration with  $473 \text{ mg.kg}^{-1}$  (data not shown). The most Cu contaminated oysters are found in the last two sampling dates in 2014

regardless of the site or the lifestyle (data not shown) after the spawning date which occurred the 07/20/2014.

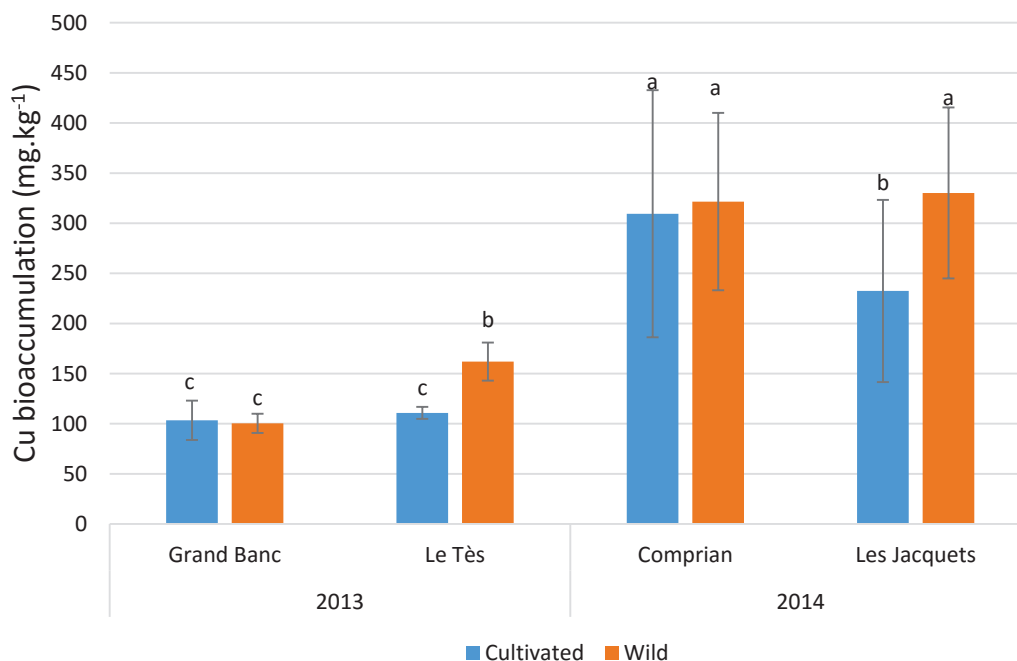


Figure 2: Copper bioaccumulation (mg.kg<sup>-1</sup>) in adults oysters from different locations in the Arcachon Bay. Data represent the average concentrations of 30 individuals in 2013 and 50 individuals in 2014 and are expressed in mg.kg<sup>-1</sup> dry weight  $\pm$  SD.

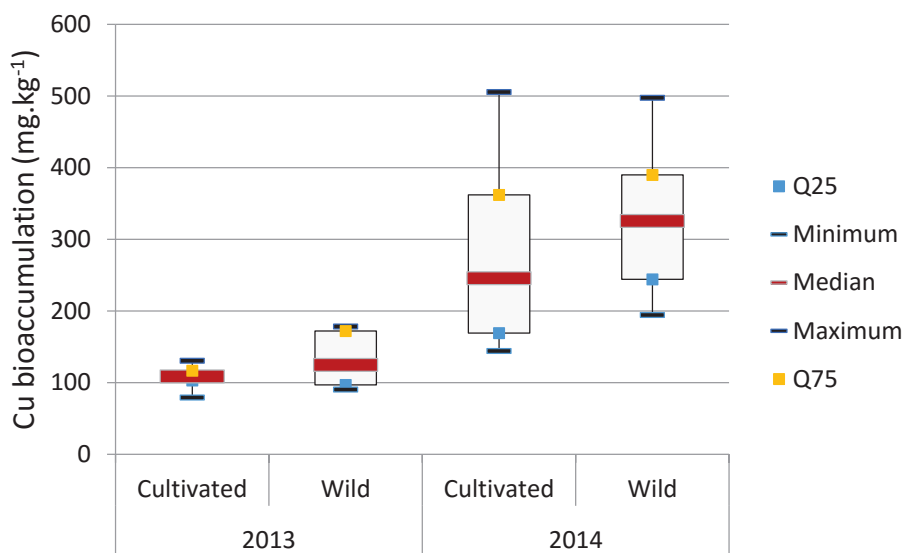


Figure 3: Copper bioaccumulation (mg.kg<sup>-1</sup>) in adults cultivated or wild oysters. Data represent the median, minimum and maximum concentrations of 30 individuals in 2013 and 50 individuals in 2014 and are expressed in mg.kg<sup>-1</sup> dry weight  $\pm$  SD.

### 3.2.2. Pesticides bioaccumulation

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

This study monitored more than 50 pesticides residues in oyster tissues. Irgarol, metolachlor and its metabolite metolachlor OA were the main chemicals detected in oysters (Fig. 4). But few compounds and low pesticide concentrations were detected during these two campaigns. There is no significant difference in the concentration for each detected compounds whatever the site or the sampling date considered. Metolachlor OA was found in cultivated oysters with a concentration between 7.3 to 16.9 ng.g<sup>-1</sup> but was not detected in wild oysters. While in 2013 only three pesticides were detected: irgarol, metolachlor and metolachlor OA, in 2014, seven pesticides were detected with additional compounds: alachlore, azoxystrobine, dimetachlor and terbuthylazine. Moreover, pesticides bioaccumulation was higher for wild oysters in 2013 with a median of 0.9 ng.g<sup>-1</sup> (Fig. 5). Higher maximum bioaccumulation values were obtained for cultivated oysters in 2013 and 2014 in comparison to wild oysters.

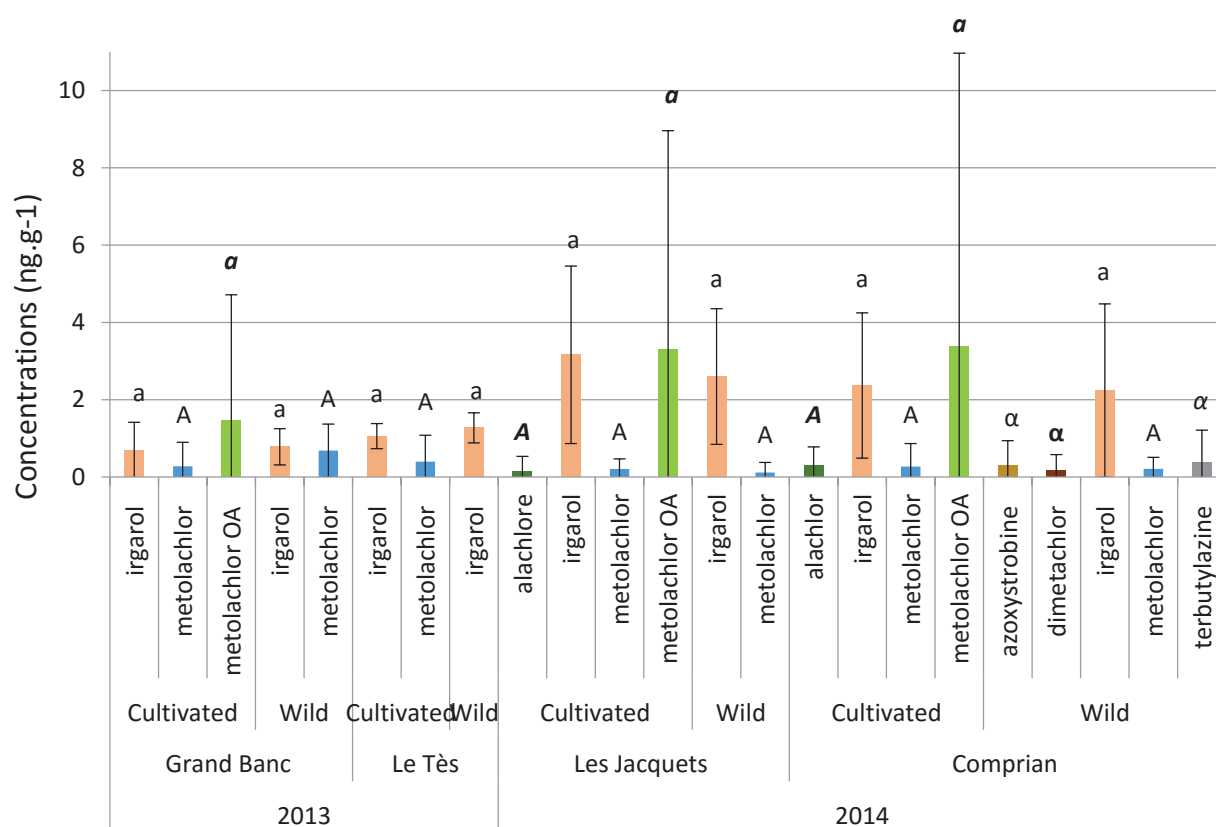


Figure 4: Metolachlor bioaccumulation (ng.g<sup>-1</sup>) in summer 2013 and 2014 in adults oysters. Data represent the average concentrations in ng.g<sup>-1</sup> dry weight  $\pm$  SD of the 3 sampling dates in 2013 and the 5 sampling dates in 2014. Each sample represents a pool of 10 oysters.

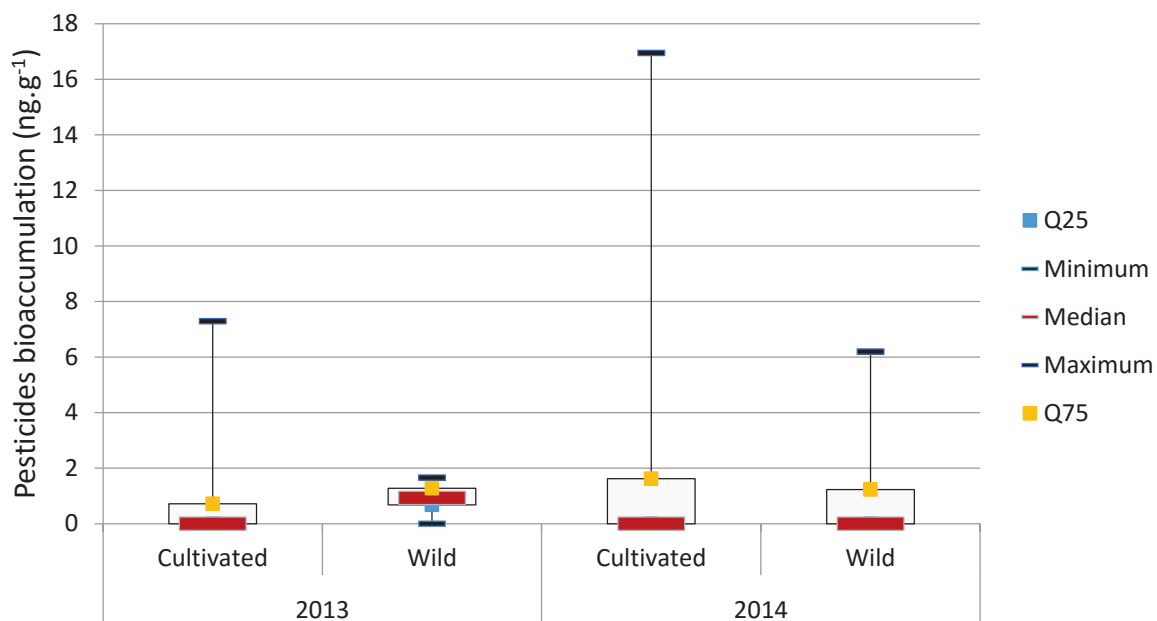


Figure 5: Metolachlor bioaccumulation ( $\text{ng.g}^{-1}$ ) in summer 2013 and 2014 in adults oysters. Data represent the median, minimum and maximum concentrations in  $\text{ng.g}^{-1}$  dry weight  $\pm$  SD of the cultivated or wild oysters in summer 2013 and 2014. Each sample represent a pool of 30 oysters in 2013 or 50 oysters in 2014

### 3.3 Larval abnormalities

In control condition, the percentage of larval abnormalities range from 4 to 43 % with an average of  $15.5 \pm 6.9$  % for oysters from the Arcachon bay. The highest background level of abnormalities was observed for cultivated oysters at Grand Banc with an average of  $27 \pm 9$  %. For hatchery's oysters values range from 8 to 23 % with an average of  $14 \pm 4.6$  %.

For all studied conditions, after a 24h exposure to  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  of copper, a significant increase of the percentage of abnormal D-larvae was observed ( $p < 0.05$ ) in comparison with the control (Fig.6) excepted for the cultivated oysters in Grand banc in 2013. For embryos exposed to  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  of Cu, a median percentage of larval abnormalities over the two years sampling period was 35 % (Fig. 7) with a minimum of 5 % and a maximum of 78 %. The highest abnormal larvae rate was observed for cultivated oysters from Le Tès ( $50.2 \pm 15.9$  %).



Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

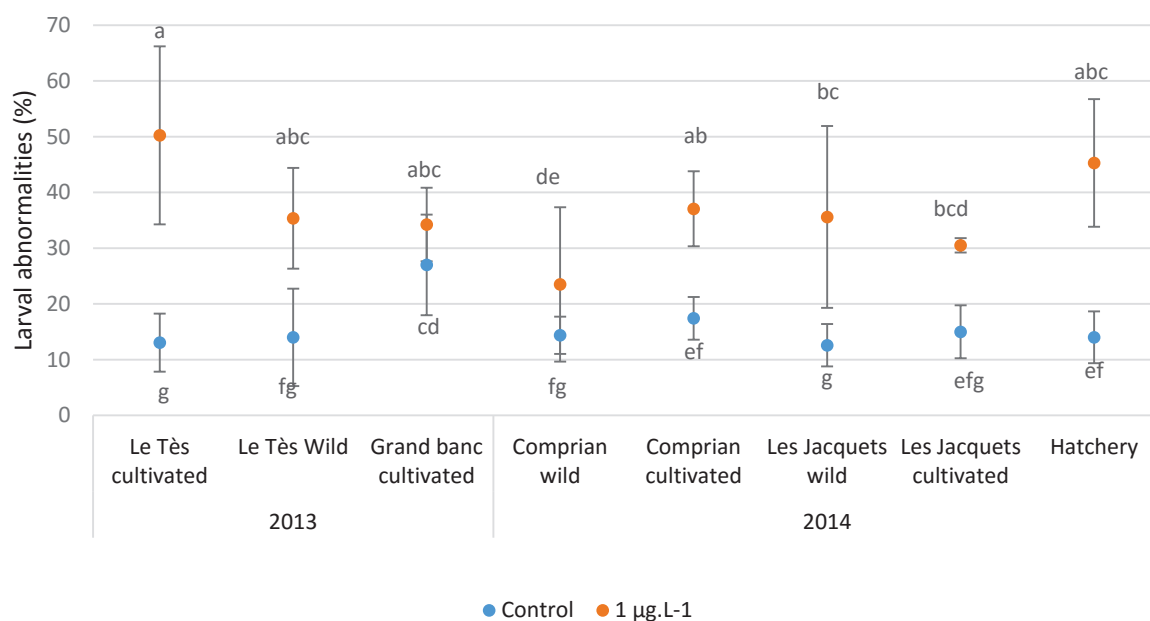


Figure 6: Percentages (Mean  $\pm$  SD) of abnormal oyster D-larvae following embryo exposure to  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  of copper. Embryos were obtained from either wild or cultivated oysters from the Arcachon bay or oysters from a hatchery. Different letters indicated significant differences between different concentrations, dates or sampling sites ( $p < 0.05$ )

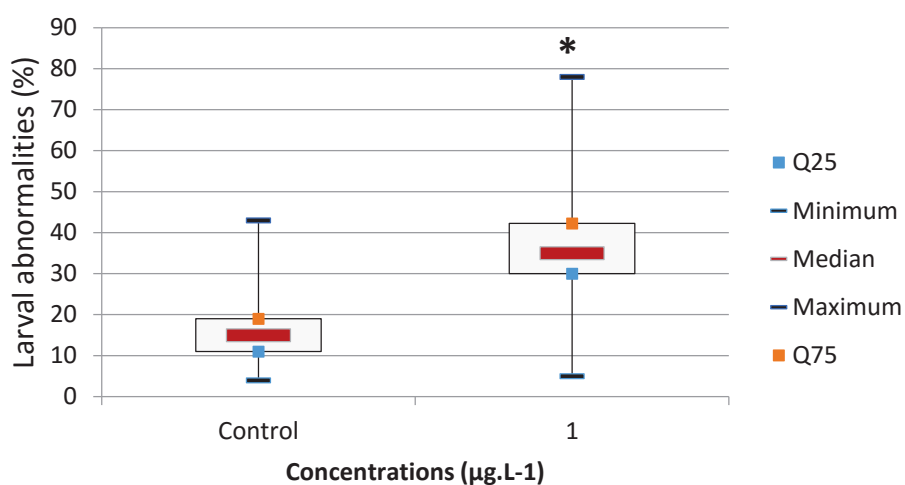


Figure 7: Median, minimum and maximum percentage of larval abnormalities after exposure to  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  of copper. Star show significant difference ( $p < 0.001$ )

The analysis of dose-response data for copper exposure (Table 5) showed that the  $24\text{hEC}_{50}$  values were  $9.8 \mu\text{g.L}^{-1}$  for hatchery's oysters and from  $7.4$  to  $14.8 \mu\text{g.L}^{-1}$  for oysters from the Arcachon Bay.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

Table 5 :  $EC_{50-24h}$  values with 95% confidence intervals (in parenthesis) for oyster D larvae exposed to copper.

	$EC_{50}$ (95CI) $\mu\text{g.L}^{-1}$
Hatchery	9.82 (8.9-10.8)
Wild oysters Comprian	14.8 (11.5-19)
Cultivated oysters Comprian	7.7 (6.7-8.8)
Wild oysters Les Jacquets	10.5 (8-14)
Cultivated oysters Les Jacquets	7.4 (6.7-8.3)

In control conditions, the percentage of larval abnormalities range from 2 to 21 % with an average of  $13.75 \pm 4.6$  % for oysters from the Arcachon bay. For hatchery's oysters values range from 10 to 22 % with an average of  $12.1 \pm 2.8$  % (Fig 6). For all studied conditions, after a 24h exposure to  $10 \text{ ng.L}^{-1}$  metolachlor, a significant increase of the percentage of abnormal D-larvae was observed ( $p < 0.05$ ) in comparison with the control (Fig.5). For embryos exposed to metolachlor, a median percentage of larval abnormalities over the two years sampling period was 38% with the exception of the first sampling date in 2013 (07/10/2013) which was significantly higher with an average of  $57 \pm 7$  % (data not shown). Minimum and maximum values were 15 % and 67 % respectively.

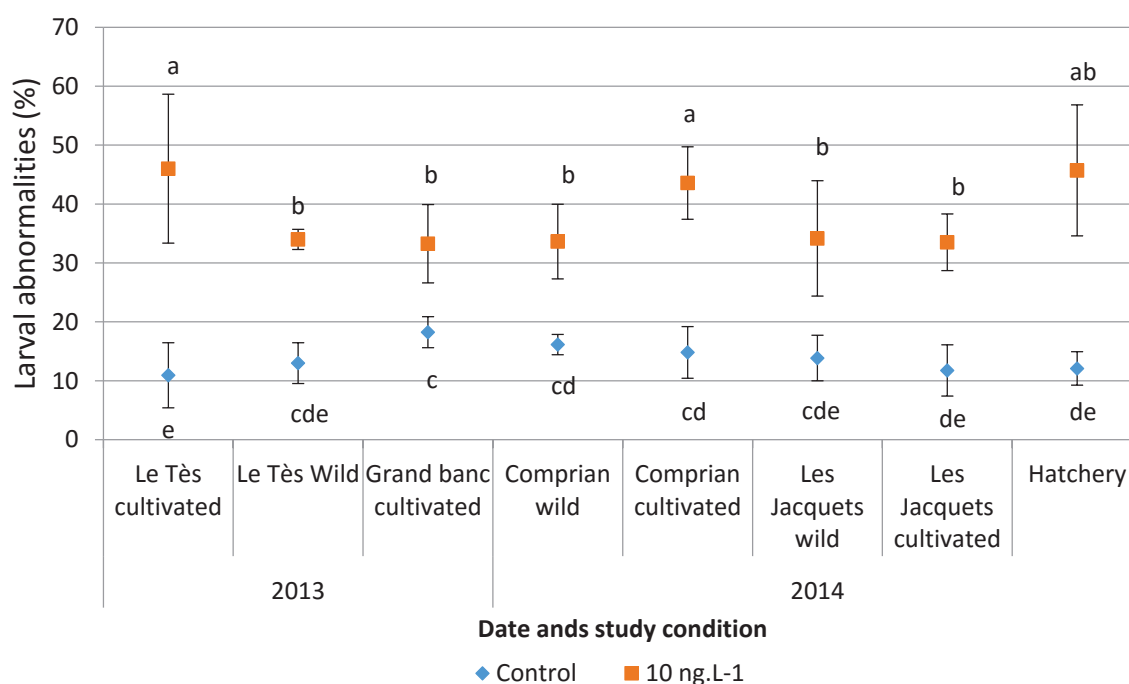


Figure 8: Percentages (Mean  $\pm$  SD) of abnormal oyster D-larvae following embryo exposure to  $10 \text{ ng.L}^{-1}$  of metolachlor. Embryos were obtained either from wild or cultivated oysters from the Arcachon bay or oysters from a hatchery. Different letters indicated significant differences between different concentrations, dates or sampling sites ( $p < 0.05$ )

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l’impact de la pollution du Bassin d’Arcachon sur le développement embryonnaire-larvaire de l’huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

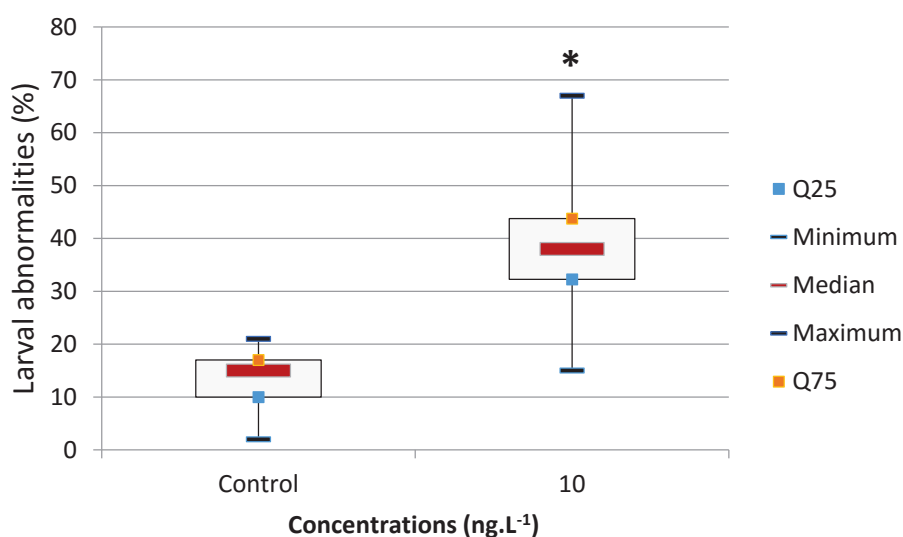


Figure 9: Median, minimum and maximum percentage of larval abnormalities after exposure to 10 ng.L<sup>-1</sup> of metolachlor. Star show significant difference ( $p < 0.001$ )

### 3.4. Correlation matrix

No correlation of developmental abnormalities was observed to the lifestyle of brood stocks except at 10 ng.L<sup>-1</sup> of metolachlor on the 7/22/2013 ( $p$ -value  $< 0.0001$ ). No more correlation was observed to the location of sampling sites or date.

Tableau 10: Results of the correlation matrix between developmental defects and temporal, spatial and lifestyle of brood stock in control conditions or in the presence of 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  of copper or 10 ng.L<sup>-1</sup> of metolachlor. The correlation is significant when the correlation coefficient and the  $p$ -value are in bold.

Lifestyle variability		Control	Cu 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Met 10 ng.L <sup>-1</sup>
Wild vs Cultivated	Le Tès	$R^2 = 0.2$ $p$ -value = 0.2	$R^2 = 0.3$ $p$ -value = 0.2	<b><math>R^2 = 1</math></b> <b><math>p</math>-value &lt; 0.0001</b>
Wild vs Cultivated	Comprian	$R^2 = 0.4$ $p$ -value = 0.4	$R^2 = 0.1$ $p$ -value = 0.7	$R^2 = 0.1$ $p$ -value = 0.7
Wild vs Cultivated	Les Jacquets	$R^2 = 0.08$ $p$ -value = 0.5	$R^2 = 0.04$ $p$ -value = 0.9	$R^2 = 0.2$ $p$ -value = 1
Spatial variability				
Comprian vs Les Jacquets	Wild	$R^2 = 0.02$ $p$ -value = 0.9	$R^2 = 0.01$ $p$ -value = 0.9	$R^2 = 0.7$ $p$ -value = 0.3
Comprian vs Les Jacquets	Cultivated	$R^2 = 0.02$ $p$ -value = 0.7	$R^2 = 0.4$ $p$ -value = 0.3	$R^2 = 0.6$ $p$ -value = 0.3
Comprian vs Les Jacquets	Wild	$R^2 = 0.001$ $p$ -value = 0.001	$R^2 = 0.6$ $p$ -value = 0.3	$R^2 = 0.2$ $p$ -value = 1
Temporal variability				
2013 vs 2014	Cultivated	$R^2 = 0.001$ $p$ -value = 0.918	$R^2 = 0.021$ $p$ -value = 0.539	$R^2 = -0.015$ $p$ -value = 0.610
2013 vs 2014	Wild	$R^2 = 0.157$ $p$ -value = 0.332	$R^2 = 0.011$ $p$ -value = 0.980	$R^2 = 0.866$ $p$ -value = 0.070

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

In some applications, the coefficient of variation (CV) is considered as a more informative quantity than the standard deviation. CV is well-known and used to compare the variability of populations characterized by different means. Coefficients of variation are relatively heterogeneous for the different control and metolachlor or Cu exposure conditions, whatever the parameter studied (Table 11).

Table 11: Coefficient of variation (%) of data in control conditions or in the presence of  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  of copper or  $10 \text{ng.L}^{-1}$  of metolachlor in different temporal, spatial and lifestyle conditions.

Lifestyle variability		Control	Cu $1 \mu\text{g.L}^{-1}$	Met $10 \text{ng.L}^{-1}$
Cultivated	Le Tès	4	6.3	6.7
Wild		2	3.9	19.7
Cultivated	Comprian	3.3	4.9	7.1
Wild		5.9	8.4	6.5
Cultivated	Les Jacquets	2.9	23.6	6.9
Wild		6.7	6.6	8.2
<b>Spatial variability</b>				
Comprian Les Jacquets	Wild	4.3	1.6	7.8
		2.9	1.5	7.6
Comprian Les Jacquets	Cultivated	3.2	4.1	7.1
		2.9	23.6	6.9
Comprian Les Jacquets	Wild	5.9	8.4	6.5
		6.7	6.6	8.3
<b>Temporal variability</b>				
2013 vs 2014	Cultivated	1.9	2.9	3.4
		4.1	5.4	5.8
2013 vs 2014	Wild	1.6	3.9	19.7
		3.8	1.9	3.5

#### 4. Discussion

##### Water reference analysis in relation to D-larvae development

Anthropogenic activities, such as the growing use of copper as an antifouling (Claisse and Alzieu, 1993), have resulted in copper becoming increasingly prevalent in coastal ecosystems. The most recent data in the Arcachon bay indicate a copper mean concentrations of  $0.8 \mu\text{g.L}^{-1}$  and  $1.1 \mu\text{g.L}^{-1}$  for water collected in April 2011 and October 2013 respectively (Gamain et al., 2016d; Mai et al., 2012). In our study, copper analysis revealed higher concentrations in the seawater sampled in summer 2013 with an average concentration of  $3.5 \mu\text{g.L}^{-1}$  compare to summer 2014 where an average concentration of  $1.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ . However, in 2014 higher levels were recorded in mid-July to mid-August at the entrance of

the bay (Arguin), exceeding the usual value by three to four fold (data not shown). It could likely be related to the increased Cu inputs in summer time due to the increased boating activity at the Banc d'Arguin and to the enclosed geometry of this site (surrounded by numerous sandbanks). Actually, copper mean concentration in sea water collected in the Banc d'Arguin outside of summer time was  $0.9 \pm 0.3 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Interestingly, the larval abnormalities obtained for all control conditions did not show significant differences ( $14 \% \pm 4.8$  and  $13 \pm 5.2$  for oysters from the Arcachon bay or oyster from hatchery respectively), although the reference seawaters was differently contaminated with copper and oysters were from different origins. Metolachlor is one of the most intensively used herbicides in agriculture in the watershed of the Arcachon bay and the most encountered in the water column (Auby et al., 2007; Budzinski et al., 2011). Chemical analysis showed that metolachlor concentration during summer season in the seawater was higher in 2013 ( $16.5 \pm 9.8 \text{ ng.L}^{-1}$ ) than in 2014 ( $4 \pm 1.2 \text{ ng.L}^{-1}$ ). This is in accordance with published values indicating a metolachlor concentration ranged from a minimum of  $2 \text{ ng.L}^{-1}$  to a maximum of  $10 \text{ ng.L}^{-1}$  for the Arcachon Bay during spring and summer (Budzinski et al., 2011, Mai et al., 2012, Mai et al., 2014, Gamain et al., 2016). Higher pollutant concentrations were particularly noticed for the water sample collected the 10th of July 2013 at Le Tès and Grand Banc with  $30$  and  $27 \text{ ng.L}^{-1}$  of metolachlor respectively. Metolachlor concentration outside the summer time (Guernsey experience) was in the same range than in 2014 with a concentration of about  $2 \pm 1.2 \text{ ng.L}^{-1}$ . As for Cu experiences, no significant difference was observed in the percentage of larval abnormalities in control condition between oysters from the Arcachon bay and oysters from the hatchery. Maybe that adult oysters from Arcachon which have been living all their life in a contaminated area and their offspring were therefore able to withstand the toxic effects of contaminant. Previous study have shown greatly resistance of *Crassostrea sikamea* offspring to Cu and zinc, dependent on the levels of pollution experienced by adults (Weng and Wang, 2014a). More the site is contaminated, more offspring is tolerant to metal exposure. Genetic and epigenetic studies are in progress to determine it.

### **Influence of lifestyle and sampling date on bioaccumulation**

In addition to the water column chemistry, health of aquatic environments can be monitored using bivalves organisms, particularly mussels and oysters (Lauenstein, 1995). Because of their biological and ecological characteristics (e.g. capacity of bioaccumulation, worldwide distribution, abundance of their populations and sessile nature), bivalves are among the best bioindicator species for pollution biomonitoring (Bustamante et al., 2012; Luo et al., 2014). Oysters are filter organism which can bioaccumulate and therefore strongly concentrate a large variety of pollutants. Copper concentrations in oyster tissues were significantly lower in 2013 compared to 2014 ( $119.1 \text{ mg.kg}^{-1} \pm 29$  and  $298.4$

mg.kg<sup>-1</sup> ± 103.9 respectively). Cu concentrations in 2014 are higher than the national median which is evaluated at 206 mg.kg<sup>-1</sup> for the period 2003-2007 in the Arcachon Bay (ROCCH, 2015). In recent years, concentrations of around 400 mg.kg<sup>-1</sup> dry weight (Ifremer, 2014) were reached. These data are in accordance with this work and confirmed the temporal increase of copper bioaccumulation in oysters from the Arcachon bay. For the oyster, *Crassostrea gigas*, dissolved copper in ambient water, as opposed to copper in phytoplankton food and sediment, has been shown to be the most important source of copper in tissues (Ettajani and Amiard, 1995). However, in the present study, the correlation between the copper concentration in oyster tissues and in the water column was weak. Actually, water contamination is very variable and the spot-sampling techniques used in this study can miss episodic pollution events, unlike oysters immersed in water throughout their life which will integrate pollution over time. Wild oysters have accumulated more copper than cultivated oysters. Wild oysters in contrast to cultivated ones are present in the same environment all their life, accumulating pollutants over their all life. Unlike wild oysters living in the water-sediment interface, farmed oysters are cultured in bags laid across trestles, which may cause differences in accumulated metals due notably to different efficiency and rate of ingestion. In 2013, wild oysters collected at "Le Tès" have bioaccumulated more copper than oysters collected at "Grand Banc". Le Tès is located inside the lagoon and retention time of water and pollutants is more important at this site (Plus et al., 2009). In 2014, a higher Cu accumulation was observed for the two last sampling dates (21 of July and 8 of August) for wild and cultivated oysters (data not shown). This can be explained by the decrease of oysters' body weight after spawning. Indeed, the main spawning episode in the Bay was recorded the 20th of July (Ifremer, 2014). A total of 7 of the 53 pesticides and their metabolites analyzed were detected in the tissues showing that these molecules can be directly bioaccumulated by the oysters. Bivalve molluscs accumulate pesticides primarily by filtering the water, initially storing such compounds in the gills (Gunkel and Streit, 1980). Pesticide accumulation depends on their concentration in the water and on their octanol-water partition coefficient (Muñoz and Rosés, 2000). Since 2010, REPAR network monitors a wide range of pesticide molecules in the Arcachon Bay but also in the tributaries (Budzinski et al., 2011). Total average concentration of the 57 measured pesticides was 45 ± 31 ng.L<sup>-1</sup> in Arguin and 95±78 ng.L<sup>-1</sup> in Grand Banc in 2010 (Budzinski et al., 2011). Antifouling biocides such as irgarol, diuron and its metabolite DCPMU, as well as DMSA and DMST were detected in the Arcachon Bay mostly at low concentrations <10 ng.L<sup>-1</sup> (Budzinski et al., 2011; Fauvelle et al., 2012). The most abundant pesticides found are metolachlor and alachlor with a dominance of their metabolites (Auby et al., 2007; Budzinski et al., 2011). Relatively low pesticide concentrations were detected in oyster tissues in 2013 and 2014 (<10 ng.g<sup>-1</sup> dw) even if higher concentrations for irgarol (2.6 ±1.9 and 0.9 ± 0.5 ng.g<sup>-1</sup> respectively) and metolachlor OA (3.3 ± 6.1 and 1.5 ± 3.2 ng.g<sup>-1</sup> respectively) and more

compounds (alachlore, azoxystrobine, dimetachlor and terbutylazine) were detected in 2014 than in 2013. Interestingly, the metolachlor OA was never detected in wild oysters instead of cultivated oysters. It could be explain by the fact that S-metolachlor has never been identified in sediments of the Arcachon bay (Auby et al., 2007). Very few studies have investigated currently used pesticides which are far less hydrophobic than legacy pesticides. In most of the studies, no pesticides are detected in the flesh of oysters in the field but artificial exposure experiments can led to an accumulation of pesticides (Buisson et al., 2008). For instance, none of the acetanilide herbicides were detected in oysters despite their high concentration in the water (up to 60 ng.L<sup>-1</sup> at some dates) of Chesapeake Bay in Maryland (Lehotay et al., 1998). Studies conducted in controlled conditions on oysters exposed at relatively high concentrations of diuron for short period of time demonstrate that diuron is very rapidly bioaccumulated in oyster soft tissues (Luna-acosta et al., 2012). Our results showed that oysters sampled the summer 2014 have bioaccumulated more organic and inorganic pollutants than in the summer 2013. However, the amount of copper and pesticides accumulated in soft tissues of oyster genitors from the Arcachon Bay does not seem to alter embryo development of offspring at least till D-larvae stage. In fact, although oysters were more contaminated in 2014, embryotoxic effects were obtained at lower concentrations for both contaminants with an increase by a factor 2 to 5 between control condition and environmental concentrations. There is no significant difference between 2013 and 2014 whatever the site or the contaminant. Only 20.8 % and 8.6 % respectively of the variability of the percentage of larval abnormalities in the absence of added contamination is explained by sampling condition (date and location) and lifestyle in 2013 and 2014 respectively. Following Cu exposure 26.5 % and 9.4 % of larval abnormality variability is explained by sampling condition (date and location) and lifestyle in 2013 and 2014 respectively and following metolachlore exposure 25.2 % and 55.5 % is related in 2013 and 2014 respectively. So the rest of the variability could be related to inter-individual variability, toxic effects of pollutants. To exploit these results, genetic studies are underway on oysters from the 2014 sampling.

### **Effect of spatial, temporal parameters and lifestyle of oyster genitors on offspring development**

Besides, water contaminant can be filtered by adult oysters without being bioaccumulated. These pollutants could also interfere with the physiology of genitors and notably their capacity to produce normal D-larvae. In control condition, no significant difference was observed between the different origins of oyster studied. However, in 2013, adult oysters were collected in a seawater four times more contaminated with metolachlor ( $16.5 \pm 9.8$  ng.L<sup>-1</sup>) than during summer of 2014 ( $4 \pm 1.2$  ng.L<sup>-1</sup>). It can be assumed that oysters collected in 2013 could have developed molecular or physiological

adaptations which would allow the progeny to be more resistant to contaminant exposure. This hypothesis could explain the similar percentage of larval abnormalities in 2013 and 2014 respectively while exposure to metolachlor was significantly different with  $30.3 \pm 11.4 \text{ ng.L}^{-1}$  and  $18 \pm 5.3 \text{ ng.L}^{-1}$  respectively.

For exposure at lower pollutant concentrations, the response in term of developmental defect is enhanced with hatchery oyster compared to native oysters. Indeed, as the mean larval abnormalities for hatchery oysters is almost always the highest, although not statistically significant due to large variations between oyster couples, hatchery oysters seem more sensitive than oysters from Arcachon. But, following copper exposure,  $24\text{hEC}_{50}$  of  $9.82 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  larvae from hatchery and between 7.4 to  $14.8 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  for D-larvae from the Arcachon bay demonstrate the sensitivities in the same value range.

Correlation matrices were used to study the relationships between lifestyles and sampled locations. In general, there was no correlation between wild and cultivated oysters from the same sampling sites concerning developmental defects in their progeny with or without exposure to pollutants. However following metolachlor exposure, the percentage of larval abnormalities between cultivated and wild oysters from Le Tès was positively correlated ( $p\text{-value} < 0.0001$ ). Moreover, relatively low and homogenous CV values were obtained in control conditions or in the presence of contaminant.

Most of our results showed no correlation between different sampling sites either in control or in the presence of both contaminants. In control conditions, the CV values were relatively different according to sampling site for both control conditions and metolachlore or Cu exposure.

## Conclusion

Bioaccumulation of Cu, and to a lesser extent metolachlore, was observed in oysters from the Arcachon Bay. A temporal trend was observed with higher bioaccumulation levels in 2014 than in 2013. In addition Cu bioaccumulation was higher in wild specimens than in cultivated ones.

This study demonstrated that environmental concentrations of copper, and metolachlor can induce developmental abnormalities in the progeny of farmed and wild populations of oysters from the Arcachon bay.

Quality of offspring and sensitivity of D-larvae to pollutants are not correlated to the spatial, date or lifestyle parameters of the broodstock oyster of the Arcachon Bay.



Oyster from Guernsey hatchery respond to pollutant exposure with the same pattern but with a higher sensitivity. A possible resilience capacity of adult oysters from the Arcachon Bay to the contaminant could be transmitted to D-larvae.

### Acknowledgements

The authors thank the Aquitaine Region (OSQUAR Project), CPER A2E, Intermunicipal Union of Arcachon Bay (SIBA) and Water Agency Adour Garonne (AEAG) for their financial supports. We gratefully acknowledge the staff of the SEPANSO for their help to get the reference seawater. This work was part of the LABEX COTE cluster of excellence "Continental To coastal Ecosystems: evolution, adaptability and gouvernance". The authors would like to thank James Emery for providing English proofreading services.

### References

- Aaseth, J., Norseth, T., 1986. Handbook on the toxicology of metals 2, in: New York, NY : Elsevier Science Publishers. pp. 233–254.
- Adams, S.M., 2005. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems, in: Marine Pollution Bulletin. pp. 649–657. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.11.040
- 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 biomarkers for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Mar. Environ. Res.* 28, 459–464.
- Adour-Garonne, A. de l’eau, 2013. Agence de l’eau Adour-Garonne - Journée technique « Qualité des eaux littorales : suivi et enjeux » Jeudi 20 juin 2013 – Espace culturel de Biganos (33) 1–5.
- Aerts, S., Haesbroeck, G., Ruwet, C., 2015. Multivariate coefficients of variation : Comparison and influence functions. *J. Multivar. Anal.* 142, 183–198. doi:10.1016/j.jmva.2015.08.006
- Agreste Primeur, 2014. Recensement de la conchyliculture 2012 160 000 tonnes de coquillages commercialisés 1–6.
- Akcha, F., Spagnol, C., Rouxel, J., 2012. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquat. Toxicol.* 106-107, 104–113. doi:10.1016/j.aquatox.2011.10.018
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160–202. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015
- Auby, I., 1991. Contribution à l’étude des herbiers de *Zostera noltii* dans le Bassin d' Arcachon : dynamique, production et dégradation, macrofaune associée. Volume 1 357.
- Auby, I., Bocquene, G., Quiniou, F., Dreno, J.P., 2007. Etat de la contamination du Bassin d’Arcachon par les insecticides et les herbicides sur la période 2005-2006. *Impact environnemental* 24, 108.
- Auby, I., Bost, C.-A., Budzinski, H., Dalloyau, S., Desternes, A., Belles, A., Trut, G., Plus, M., Pere, C., Couzi, L., Feigne, C., Steinmetz, J., 2011. Régression des herbiers de zostères dans le Bassin d’ Arcachon : état des lieux et recherche des causes Régression des herbiers de zostères dans le Bassin d’ Arcachon : état des lieux et recherche des causes. Ifremer ODE LER Arcachon 195.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Auby, I., Maurer, D., 2004a. Etude de la reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon. Ifremer.
- Auby, I., Maurer, D., 2004b. Etude de la reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon Rapport final.
- Auby, I., Maurer, D., 2014. Rôle des communautés phytoplanctoniques sur la reproduction de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) dans le bassin d'Arcachon 48 p.
- Auby, I., Maurer, D., Connès, C., Barbier, C., Perrière-Rumèbe, M., Rigouin, L., Tournaire, M.-P., 2012. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon Année 2012. IFREMER 1–63.
- Auby, I., Maurer, D., Passoni, S., Heroïn, D., Rigouin, L., Méteigner, C., Perrière-Rumèbe, M., Tournaire, M.-P., 2014. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon Année 2014. Ifremer 55.
- Auby, I., Oger-Jeanneret, H., Sauriau, P.-G., Hily, C., Barillé, L., 2010. Angiospermes des côtes françaises Manche-Atlantique. Propositions pour un indicateur DCE et premières estimations de la qualité. Annexe 2 : Fiches contenant les données sur les herbiers des différentes masses d'eau suivies dans le cadre de la DCE 152.
- Auffret, M., Oubella, R., 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comp. Biochem. Physiol. - A Physiol.* 118, 705–712. doi:10.1016/S0300-9629(97)00017-0
- Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Le Floch, S., Renault, T., 2008. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Toxicol. Vitro.* 22, 1610–1617. doi:10.1016/j.tiv.2008.04.011
- Baize, D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France), in: Institut National de La Recherche Agronomique INRA. p. 409.
- Barouki, R., 2006. Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/Sciences* 22, 266–272. doi:10.1016/S0985-0562(02)00173-5
- Barros, P., Sobral, P., Range, P., Chícharo, L., Matias, D., 2013. Effects of sea-water acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 440, 200–206. doi:10.1016/j.jembe.2012.12.014
- Bebianno, M.J., Serafim, M. a., 1998. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. *Sci. Total Environ.* 214, 123–131. doi:10.1016/S0048-9697(98)00059-X
- Beiras, R., Albentosa, M., 2004. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals; implications for the implementation of seawater quality criteria. *Aquaculture* 230, 205–213. doi:10.1016/S0044-8486(03)00432-0
- Beiras, R., His, E., 1995. Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival and growth of *Mytilus galloprovincialis* mussel larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 126, 185–189. doi:10.3354/meps126185
- Belin, C., Neaud-Masson, N., 2012. Cahier de Procédures REPHY 2012-2013 82.
- Ben Kheder, R., 2007. Étude sur le développement larvaire de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) en conditions contrôlées : recherche d'indices de qualité.
- Bernard, G., Bonhomme, P., Boudouresque, C.F., 2005. Recovery of the seagrass *Zostera marina* in a disturbed Mediterranean lagoon (Etang de Berre, Bouches-du-Rhône, Southern France). *Hydrobiologia* 539, 157–161. doi:10.1007/s10750-004-3080-7

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l’impact de la pollution du Bassin d’Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Bernard, I., 2011. Écologie de la reproduction de l’huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les côtes atlantiques françaises : Vers une explication de la variabilité du captage.
- Bessi, H., ElAlami, M., 2009. Les bio-essais dans l’évaluation d’impact des polluants sur les écosystèmes dulçaquicoles. Les Technol. Lab. n°15 16–22.
- Bijoux, H., 2014. Étude de l’impact des contaminants chimiques du Bassin d’Arcachon sur l’huître creuse *Crassostrea gigas* ; Approche *in situ* et expérimentale 387.
- Bird, A., 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396–398. doi:10.1038/nature05913
- Bisson, M., Houeix, N., Gay, G., Lacroix, G., Lefevre, J.P., Magaud, H., Tissot, S., Migne, V., Morin, A., 2005. Cuivre et ses dérivés. INERIS 1–66.
- Blanchet, H., 2004. Structure et Fonctionnement des peuplements benthiques du Bassin D’Arcachon 223.
- Bos, A.R., Bouma, T.J., de Kort, G.L.J., van Katwijk, M.M., 2007. Ecosystem engineering by annual intertidal seagrass beds: Sediment accretion and modification. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 74, 344–348. doi:10.1016/j.ecss.2007.04.006
- Bouchet, J.-M., Deltreil, J.-P., Manaud, F., Maurer, D., Triff, G., 1997. Etude intégrée du Bassin d’Arcachon. IFREMER Tome 5.
- Bouilly, K., Gagnaire, B., Bonnard, M., Thomasguyon, H., Renault, T., Miramand, P., Lapegue, S., 2006. Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 78, 149–156. doi:10.1016/j.aquatox.2006.02.028
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004a. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, 147–157. doi:10.1016/j.gene.2003.12.027
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004b. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *Gene, an Int. J. genes genomes* 272, 147–157. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04960.x
- Brenko, M.H., Calabrese, A., 1969. The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 4, 224–226.
- Brunel, S., Fraslin, C., Kuperminc, M., Perras, M., Prevost, J., 2013. Agriculture littorale du Bassin d’Arcachon - Projet « Littoral, Interface terre-mer ». *AgroParisTech* 1–35.
- Buck, K.N., Ross, J.R.M., Russell Flegal, a., Bruland, K.W., 2007. A review of total dissolved copper and its chemical speciation in San Francisco Bay, California. *Environ. Res.* 105, 5–19. doi:10.1016/j.envres.2006.07.006
- Budzinski, H., Tapie, N., Magnan, A., Benyahia, M., 2011. Rapport REPAR 1–23.
- Buestel, D., Ropert, D., Prou, J., Gouletquer, P., 2009. History, status, and future of oyster culture in France. *J. Shellfish Res.* 28, 813–820.
- Buisson, S., Bouchart, V., Guerlet, E., Malas, J., Costil, K., 2008. Level of contamination and impact of pesticides in cupped oyster, *Crassostrea gigas*, reared in a shellfish production area in Normandy (France). *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 43, 655–664.
- Burnol, A., Duro, L., Grive, M., 2006. Eléments traces métalliques - Guide méthodologique - Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. INERIS 1–119. doi:10.1017/CBO9781107415324.004

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Bustamante, P., Luna-Acosta, a., Clemens, S., Cassi, R., Thomas-Guyon, H., Warnau, M., 2012. Bioaccumulation and metabolisation of <sup>14</sup>C-pyrene by the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed via seawater. *Chemosphere* 87, 938–944. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.049
- Cairns, J., HEATH, A.G., PARKER, B.C., 1975. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia* 47, 135–171.
- Cajaraville, M., Bebianno, M., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295–311.
- Calabrese, A., 1969. Individual and combined effects of salinity and temperature on embryos and larvae of the coot clam, *Mulinia lateralis* (Say). *Mar. Biol. Lab.* 137, 417–428.
- Calabrese, A., Collier, S., Nelson, D. a, Macinnes, J.R., 1973. The Toxicity of Heavy Metals to Embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 66, 162–166. doi:10.1007/BF00367984
- Calvet, R., 1989. Adsorption of organic chemicals in soils. *Environ. Health Perspect.* 83, 145–177. doi:10.1289/ehp.8983145
- Campbell, Reece, 2004. La biotechnologie-Chapitre 20, in: *Biologie*, 2e Edition. p. 1364.
- Carbonell, G., Tarazona, J., 1994. Toxicokinetics of copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 29, 213–221.
- Carriger, J.F., Rand, G.M., 2008. Aquatic risk assessment of pesticides in surface waters in and adjacent to the Everglades and Biscayne National Parks: I. Hazard assessment and problem formulation. *Ecotoxicology* 17, 660–679. doi:10.1007/s10646-008-0230-0
- Castañón, C., Pascual, M., Camacho, A.P., 2009. Reproductive biology of the nonnative oyster, *Crassostrea gigas* (thunberg, 1793), as a key factor for its successful spread along the rocky shores of northern patagonia, argentina. *J. Shellfish Res.* 28, 837–847.
- Chapman, P.M., Long, E.R., 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 14, 81–84. doi:10.1016/0025-326X(83)90305-3
- Chen, M., Yang, H., Delaporte, M., Zhao, S., 2007. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge. *Aquaculture* 271, 479–487. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.051
- Cheng, T., Combes, C., 1990. Influence of environmental factors on the invasion of molluscs by parasites: with special reference to Europe, in: Kluwer Academic Publishers. pp. 307–332.
- Choi, Y.K., Jo, P.G., Choi, C.Y., 2008. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 147, 286–92. doi:10.1016/j.cbpc.2007.11.002
- Claisse, D., Alzieu, C., 1993. Copper contamination as a result of antifouling paint regulations? *Mar. Pollut. Bull.* 26, 395–397. doi:10.1016/0025-326X(93)90188-P
- Clark, G.M., Goolsby, D.A., Battaglin, W.A., 1999. Seasonal and annual load of herbicides from the Mississippi River basin to the Gulf of Mexico. *Environ. Sci. Technol.* 33, 981–986. doi:10.1021/es980962u
- Cochennec-laureau, N., 2015. Rapport d'activités 2014 Laboratoire Environnement Ressources du Morbihan-Pays de Loire.
- Cochennec-Laureau, N., Baud, J.P., 2011. Bilan des surmortalités des huîtres creuses *Crassostrea gigas*

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- depuis 2008. Bull. épidémiologique 42, 2–5.
- Cognie, B., Haure, J., Barillé, L., 2006. Spatial distribution in a temperate coastal ecosystem of the wild stock of the farmed oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture 259, 249–259. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.05.037
- Connor, P.M., 1972. Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. Mar. Pollut. Bull. 3, 190–192.
- Cook, M.E., Moore, P. a., 2008. The effects of the herbicide metolachlor on agonistic behavior in the crayfish, *Orconectes rusticus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 55, 94–102. doi:10.1007/s00244-007-9088-z
- Coquillé, N., Jan, G., Moreira, A., Morin, S., 2015. Use of diatom motility features as endpoints of metolachlor toxicity. Aquat. Toxicol. 158, 202–210. doi:10.1016/j.aquatox.2014.11.021
- Cotter, E., Malham, S.K., O'Keefe, S., Lynch, S. a., Latchford, J.W., King, J.W., Beaumont, A.R., Culloty, S.C., 2010a. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of growth, biochemistry and gametogenesis. Aquaculture 303, 8–21. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.02.030
- Cotter, E., Malham, S.K., O'Keefe, S., Lynch, S.A., Latchford, J.W., King, J.W., Beaumont, A.R., Culloty, S.C., 2010b. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of growth, biochemistry and gametogenesis. Aquaculture 303, 8–21. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.02.030
- Cousins, R., 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. Physiol. Rev. 65, 238–309.
- Crespo, A., 2009. Présence et sources des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le Bassin d'Arcachon 458.
- Cunningham, F.X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K. a, DellaPenna, D., Gantt, E., 1996. Functional analysis of the B and E lycopene cyclase enzymes of arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. Plant Cell 8, 1613–1626.
- Czernichowski-Lauriol, I., Caudron, M., 1999. Pollution des eaux souterraines et superficielles par des produits phytosanitaires dans un même bassin hydrogéologique - Application dans le bassin de la Serre, département de l'Aisne. Rap. BRGM R 40615 71.
- Dagens, N., 2012. Réseau Pesticides Bassin d'Arcachon (REPAR) - Rapport d'étude - Les pratiques phytosanitaires agricoles et non agricoles sur le Bassin d'Arcachon 73.
- Dameron, C., Howe, P., 1998. Copper environmental health criteria n°200, World Health Organization. Geneva.
- Damiens, G., His, E., Quiniou, F., Roméo, M., 2004. Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. Comp. Biochem. Physiol. - Part C Toxicol. Pharmacol. 138, 121–128.
- Damiens, G., Mouneyrac, C., Quiniou, F., His, E., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., 2006. Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*. Environ. Pollut. 140, 492–499. doi:10.1016/j.envpol.2005.08.006
- Davarpanah, E., Guilhermino, L., 2015. Single and combined effects of microplastics and copper on the population growth of the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. Estuar. Coast. Shelf Sci. 167, 269–275. doi:10.1016/j.ecss.2015.07.023
- Depledge, M., 1994. The rationale basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. Non

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- destructive biomarkers in vertebrates, in: FOSSI, M.C., LEONZIO, C., Eds. Lewis Publishers. pp. 271–296.
- Deslous-Paoli, J., 1981. Toxicité des éléments métalliques dissous pour les larves d'organismes marins : données bibliographiques. Rev. des Trav. 'l Inst. des pêches Marit. 45, 73–83.
- Devi, M., Thomas, D., Barber, J., Fingerman, M., 1996. Accumulation and physiological and biochemical effects of Cadmium in a simple aquatic food chain. Ecotoxicol. Environ. Saf. 33, 38–43.
- Devier, M.-H., 2003. Etude intégrée sur l'impact des différentes classes de contaminants (composés organostanniques, métaux, HAP, PCB) sur les moules. Bioaccumulation et réponses biochimiques.
- Di Poi, C., Evariste, L., Serpentine, A., Halm-Lemeille, M.P., Lebel, J.M., Costil, K., 2013. Toxicity of five antidepressant drugs on embryo-larval development and metamorphosis success in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 21, 13302–13314. doi:10.1007/s11356-013-2211-y
- Doney, S.C., Ruckelshaus, M., Emmett Duffy, J., Barry, J.P., Chan, F., English, C. a, Galindo, H.M., Grebmeier, J.M., Hollowed, a B., Knowlton, N., Polovina, J., Rabalais, N.N., Sydeman, W.J., Talley, L.D., 2012. Climate change impacts on marine ecosystems. Ann. Rev. Mar. Sci. 4, 11–37. doi:10.1146/annurev-marine-041911-111611
- Doroudi, M., Southgate, P., Mayer, R., 1999. The combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.). Aquac. Res. 30, 271–277.
- Dorsey, A., Ingerman, L., Swarts, S., Corporation, S.R., 2004. Toxicological profile for copper. Agency Toxic Subst. Dis. Regist. Div. Toxicol. Inf. Branch 314.
- Dos Santos, A.E., Nascimento, I.A., 1985. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* guilding, 1828. Aquaculture 47, 335–352.
- Dos santos, A.E., Nascimento, I.A., 1985. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* guilding , 1828 47, 335–352.
- Du, Y., Zhang, L., Xu, F., Huang, B., Zhang, G., Li, L., 2013. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) development by quantitative real-time PCR. Fish Shellfish Immunol. 34, 939–945. doi:10.1016/j.fsi.2012.12.007
- Dubourg, B., 2012. Les huîtres triploïdes en plein débat. Sud Ouest.
- Echeverrigaray, Gomes, Tavares, 1999. Isolation and characterization of Ca<sup>2+</sup>-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 15, 679–681.
- Eisenreich, S.J., JRC, I.I., C. Bernasconi, P. Campostrini, A. De Roo, G. George, A.-S., Heiskanen, J. Hjorth, N. Hoepffner K.C. Jones, P. Noges, N., Pirrone, N. Runnalls, F. Somma, N. Stilanakis, G. Umlauf, W., van de Bund, P. Viaroli, J. Vogt, J.-M.Z., 2005. Climate Change and the European Water Dimension 1–253.
- Ettajani, H., Amiard, J.C., 1995. Biodisponibilité de quelques métaux fixés sur les matières en suspension (MES) en milieu estuarien. Hydroécologie Appliquée 7, 75–89. doi:10.1051/hydro:1995005

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- FAO, 2010. LA SITUATION MONDIALE DES PÊCHES ET DE L'AQUACULTURE - 2010. Département des pêches l'aquaculture la FAO. Organ. des nations Unies pour l'alimentation l'agriculture Rome, 241 p.
- Farcy, E., Fleury, C., Lelong, C., Dubos, M.P., Voiseux, C., Fiévet, B., Lebel, J.M., 2008. Molecular cloning of a new member of the p53 family from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and seasonal pattern of its transcriptional expression level. *Mar. Environ. ...* 66, 300–308. doi:10.1016/j.marenvres.2008.04.006
- Farcy, É., Voiseux, C., Lebel, J.M., Fiévet, B., 2009. Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress Chaperones* 14, 371–380. doi:10.1007/s12192-008-0091-8
- Fauvelle, V., N, M., F, D., K, M., M, E., H., B., 2012. Use of mixed-mode ion exchange sorbent for the passive sampling of organic acids by polar organic chemical integrative sampler (POCIS). *Environ. Sci. Technol.* 46, 13344–53. doi:10.1021/es3035279
- Fitzpatrick, J.L., Nadella, S., Bucking, C., Balshine, S., Wood, C.M., 2008. The relative sensitivity of sperm, eggs and embryos to copper in the blue mussel (*Mytilus trossulus*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 147, 441–9. doi:10.1016/j.cbpc.2008.01.012
- Flemming, C.A., Trevors, J.T., 1989a. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water. Air. Soil Pollut.* doi:10.1007/BF00228784
- Flemming, C.A., Trevors, J.T., 1989b. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water. Air. Soil Pollut.* 44, 143–158.
- Fujiya, M., 1970. Oyster farming in Japan. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 20, 464–479. doi:10.1007/BF01609922
- Gacia, E., Duarte, C.M., 2001. Sediment Retention by a Mediterranean *Posidonia oceanica* Meadow: The Balance between Deposition and Resuspension. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 52, 505–514. doi:DOI: 10.1006/ecss.2000.0753
- Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 536–547.
- Galay-Burgos, M., Spurgeon, D.J., Weeks, J.M., Stürzenbaum, S.R., Morgan, a J., Kille, P., 2003. Developing a new method for soil pollution monitoring using molecular genetic biomarkers. *Biomarkers* 8, 229–39. doi:10.1080/354750031000138685
- Galtsoff, P., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fish. Bull.* 64, 480.
- Gamain, P., Agnès Feurtet-Mazel Régine Maury-Brachet Isabelle Aubry, A.B.H.B., Daffe, G., Gonzalez, P., 2016a. Experimental ecotoxicological study of the impact of a cocktail of pesticides and copper on the seagrass *Zostera noltei* in the Arcachon bay. En préparation.
- Gamain, P., Cachot, J., Gonzalez, P., Gourves, P.Y., Budzinski, H., Morin, B., 2016b. Do temporal and spatial parameters or lifestyle of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* broodstock native from the Arcachon Bay (Southwest coast of France) affect pollutant bioaccumulation, offspring development and tolerance to pollutants? En préparation.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Clérendean, C., Budzinski, H., Mazella, N., Martin, C., Gourves, P.Y., Morin, B., 2016c. Influence of the combined effects of temperature and pollutants on embryon-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. En préparation.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Pardon, P., Tapie, N., Gourves, P.Y., Budzinski, H., Morin, B., 2016d. Combined effects of pollutants and salinity on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 113, 31–38. doi:10.1016/j.marenvres.2015.11.002
- Ganthy, F., 2011. Rôle des herbiers de zostères (*Zostera noltii*) sur la dynamique sédimentaire du Bassin d'Arcachon 284.
- Gasch, a P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O., 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 11, 4241–4257. doi:10.1091/mbc.11.12.4241
- Geffard, O., 2001. Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : évaluation chimique et biologique, biodisponibilités des contaminants sédimentaires.
- Geffard, O., Budzinski, H., His, E., 2002. The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. *Ecotoxicology* 11, 403–416. doi:10.1023/A:1021024415695
- Geffard, O., Budzinski, H., LeMenach, K., 2004. " petroleum: Bio-tests applied to petroleum water-accommodated fractions and natural contaminated samples. *Aquat. Living Resour.* 17, 289–296. doi:10.1051/alr
- Geracitano, L. a., Luquet, C., Monserrat, J.M., Bianchini, a., 2004. Histological and morphological alterations induced by copper exposure in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). *Mar. Environ. Res.* 58, 263–267. doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.069
- Gerard, A., Boudry, P., Launav, S., Heurtebise, S., Phelipot, L.E.T.P., 1995. Contrôle de la Gamétogenèse des huîtres creuses et plates . *Relations " Reproduction " Et " Génétique ."*
- Gervais, O., Renault, T., Arzul, I., 2015. Induction of apoptosis by UV in the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 232–242. doi:10.1016/j.fsi.2015.05.046
- Gieskes, J.M., Han, S., Rathburn, A., Rothwell, G., Pérez, M.E., Porrachia, M., Barbanti, A., Deheyn, D.D., 2015. Anthropogenic contaminants in Venice Lagoon sediments and their pore fluids: Results from the SIOSED Project. *Mar. Chem.* 174, 73–84. doi:10.1016/j.marchem.2015.05.008
- Gilliom, R.J., 2007. Pesticides in U.S. streams and groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3408–3414. doi:10.1021/es072531u
- Goberville, E., Beaugrand, G., Sautour, B., Tréguer, P., 2010. Climate-driven changes in coastal marine systems of western Europe. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 408, 129–147. doi:10.3354/meps08564
- Gomiero, A., Viarengo, A., 2014. Effects of elevated temperature on the toxicity of copper and oxytetracycline in the marine model, *Euplotes crassus*: A climate change perspective. *Environ. Pollut.* 194, 262–271.
- Greenwood, P., 1981. Some effects of temperature-salinity combinations on the early development of the sea urchin *Parechinus angulosus* (Leske). *Fertilization. J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 51, 119–131.
- Groisman, P.Y., Karl, T.R., Easterling, D.R., Knight, R.W., Jamason, P.F., Hennessy, K.J., Suppiah, R., Page, C.M., Wibig, J., Fortuniak, K.V.N., Douglas, A., Førland, E., Zhai, P.-M., 1999. Change in the probability of heavy precipitation : important indicators of climatic change. *Clim. Change* 42, 243–283.
- Guimaraes, A., Linden, R., 2004. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.* 271, 1638–1650. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04084.x



Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Gunkel, G., Streit, B., 1980. Mechanisms of bioaccumulation of herbicide (atrazine, s-triazine) in a freshwater mollusc (*Ancylus fluviatilis mull.*) and a fish (*Coregonus fera jurine*). *Water Res.* 14, 1573–1584.
- Hadfield, M.G., 2000. Why and how marine-invertebrate larvae metamorphose so fast. *CELL Dev. Biol.* 11, 437–443. doi:10.1006/scdb.2000.0197
- Hamdoun, A.M., Cheney, D.P., Cherr, G.N., 2003a. Phenotypic Plasticity of HSP70 and HSP70 Gene Expression in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*): Implications for Thermal Limits and Induction of Thermal Tolerance. *Biol. Bull.* 205, 160–169.
- Hamdoun, A.M., Cheney, D.P., Cherr, G.N., Box, P.O., Bay, B., Ave, S., Toxicology, E., Davis, C., 2003b. Phenotypic Plasticity of HSP70 and HSP70 Gene Expression in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*): Implications for Thermal Limits and Induction of Thermal Tolerance 160 –169. doi:10.2307/1543236
- Hartmann, D.J., Klein Tank, A.M.G., Rusticucci, M., Alexander, L. V, Brönnimann, S., Charabi, Y.A.-R., Dentener, F.J., Dlugokencky, E.J., Easterling, D.R., Kaplan, A., Soden, B.J., Thorne, P.W., Wild, M., Zhai, P., 2013. Observations: Atmosphere and Surface. *Clim. Chang.* 2013 Phys. Sci. Basis. Contrib. Work. Gr. I to Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang. 159–254. doi:10.1017/CBO9781107415324.008
- Helm, M.M., Millican, P.F., 1977. Experiments in the hatchery rearing of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 11, 1–12.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals, *Rhinology*. Supplement. doi:10.1159/0003199858
- Heugens, E.H.W., Jager, T., Creighton, R., Kraak, M.H.S., Hendriks, a. J., Van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2003. Temperature-dependent effects of cadmium on *daphnia magna*: Accumulation versus sensitivity. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2145–2151. doi:10.1021/es0264347
- His, E., 1976. La detection des pontes dans le milieu naturel : application de l'ostréographie a l'etude de la reproduction des huîtres. *Haliotis* 5, 10.
- His, E., 1991. Biologie et écotoxicologie des végétales de *Crassostrea gigas* (Thunberg) dans le Bassin d'Arcachon.
- His, E., Beiras, R., Quiniou, F., Parr, A.C.S., Smith, M.J., Cowling, M.J., Hodgkiss, T., 1996. The non-toxic effects of a novel antifouling material on oyster culture. *Water Res.* 30, 2822–2825.
- His, E., Beiras, R., Silhouette, C., 1997. A Simplification the Bivalve Embryogenesis and Larval Development Bioassay Method for Water Quality Assessment. *Water. Res* 31, 351–355. doi:10.1016/S0043-1354(96)00244-8
- His, E., Heyvang, I., Geffard, O., De Montaudouin, X., 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Res.* 33, 1706–1718. doi:10.1016/S0043-1354(98)00381-9
- His, E., Robert, R., 1982. Le danger des traitements par le sulfate de cuivre en zone conchylicole : toxicité vis-à-vis des oeufs et des jeunes larves de *Crassostrea gigas*. *Rev. des Trav. l'Institut des Pêches Marit.* 45, 117–125.
- His, E., Robert, R., Dinet, A., 1989a. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l’impact de la pollution du Bassin d’Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- His, E., Robert, R., Dinet, A., 1989b. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 100, 455–463.
- His, E., Seaman, M., 1993. Effects of twelve pesticides on larvae of oysters (*Crassostrea gigas*) and on two species of unicellular marine algae (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*). *ICES Mar. Environ. Qual. Comm.* 8.
- Hodson, P., Borgmann, U., Shear, H., 1979. Copper in the environment: Part 2 Health Effects, in: J. O. Nriagu, Ed., John Wiley & Sons Ltd, Toronto. pp. 307–372.
- Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P.J., Hooten, A.J., Steneck, R.S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C.D., Sale, P.F., Edwards, A.J., Caldeira, K., Knowlton, N., Eakin, C.M., Iglesias-Prieto, R., Muthiga, N., Bradbury, R.H., Dubi, A., Hatzilo, M.E., 2007. Coral reefs under rapid climate change and Ocean Acidification. *Sci. mag* 318, 1737–1742.
- Hollows, C., Johnston, E., Marshall, D., 2007. Copper reduces fertilization success and exacerbates Allee effects in the field. *Mar. Pollut. Bull.* 333, 51–60.
- Holmstrup, M., Bindsø, A.-M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.-R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Ferreira, A.L.G., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P.E., Bayley, M., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Sci. Total Environ.* 408, 3746–3762. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.10.067
- Horiguchi, T., Imai, T., Cho, H.S., Shiraishi, H., Shibata, Y., Morita, M., Shimizu, M., 1998. Acute toxicity of organotin compounds to the larvae of the rock shell, *Thais clavigera*, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the giant abalone, *Haliotis madaka*. *Mar. Environ. Res.* 46, 469–473. doi:10.1016/S0141-1136(97)00058-5
- Hrs-Brenko, M., 1981. The growth and survival of larvae of several bivalve species at high temperatures and the practicability of their culture in heated effluent waters. *Acta Biol. Iugosl. Ichthyol.* 13, 29–37.
- Hrs-Brenko, M., Calabrese, A., 1969. The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 4, 224–226.
- Hrs-Brenko, M., Claus, C., Bubic, S., 1977. Synergistic effects of lead, salinity and temperature on embryonic development of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biol.* 44, 109–115. doi:10.1007/BF00386951
- Hung, T.-C., Meng, P.-J., Han, B.-C., Chuang, A., Huang, C.-C., 2001. Trace metals in different species of mollusca, water and sediments from Taiwan coastal area. *Chemosphere* 44, 833–841.
- Ifremer, 2008. Impact potentiel des activités nautiques sur la qualité des eaux du Bassin d’ Arcachon. IFREMER 35.
- Ifremer, 2009. Fiche d’ information Ifremer - Les huîtres triploïdes - Fiche Aquaculture du 27 novembre 2009.
- Ifremer, 2014. Qualité du Milieu Marin Littoral - Bulletin de la surveillance - Edition 2014 131.
- IPCC, 2013. Working group I contribution to the IPCC fifth assessment report climate change 2013 : The physical science basis final draft underlying scientific-technical assessment.
- Jones, C.G., Lawron, J.H., Shachak, M., 1997. Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology* 78, 1946–1957. doi:10.1890/0012-

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l’impact de la pollution du Bassin d’Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

9658(1997)078[1946:PANEOO]2.0.CO;2

- Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M., 1994. Organisms as Ecosystem Engineers Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69, 373–386.
- Kinne, 1964. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. II. Salinity and temperature-salinity combinations. *Ocean. Mar. Biol. Annu. Rev.* 2, 281–339.
- Ko, G.W.K., Dineshram, R., Campanati, C., Vera, C.B.S., Havenhand, J., Thiyagarajan, V., 2014. Interactive Effects of Ocean Acidification, Elevated Temperature and Reduced Salinity on Early-Life Stages of the Pacific Oyster. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10079–10088. doi:10.1021/es501611u
- Kroeker, K.J., Kordas, R.L., Crim, R., Hendriks, I.E., Ramajo, L., Singh, G.S., Duarte, C.M., Gattuso, J.P., 2013. Impacts of ocean acidification on marine organisms: Quantifying sensitivities and interaction with warming. *Glob. Chang. Biol.* 19, 1884–1896. doi:10.1111/gcb.12179
- Kroeker, K.J., Kordas, R.L., Crim, R.N., Singh, G.G., 2010. Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecol. Lett.* 13( 11), 1419–1434.
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R., 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* (80-. ). 319, 1827–1830. doi:10.1126/science.1153069
- Kumar, a., Correll, R., Grocke, S., Bajet, C., 2010. Toxicity of selected pesticides to freshwater shrimp, *Paratya australiensis* (Decapoda: Atyidae): Use of time series acute toxicity data to predict chronic lethality. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 360–369. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.09.001
- Kurihara, H., Kato, S., Ishimatsu, A., 2007. Effects of increased seawater pCO<sub>2</sub> on early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Biol.* 1, 91–98. doi:10.3354/ab00009
- Lahman, S.E., Trent, K.R., Moore, P. a., 2015. Sublethal copper toxicity impairs chemical orientation in the crayfish, *Orconectes rusticus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 369–377. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.12.022
- Lannig, G., Flores, J.F., Sokolova, I.M., 2006. Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: Pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquat. Toxicol.* 79, 278–287.
- Lauenstein, G.G., 1995. Comparison of organic contaminants found in mussels and oysters from a current mussel watch project with those from archived mollusc samples of the 1970s. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 826–833. doi:10.1016/0025-326X(95)00089-6
- Le Berre, I., Hily, C., Lejart, M., Gouill, R., 2009. Analyse spatiale de la prolifération de *C. gigas* en Bretagne. *Cybergeo Eur. J. Geogr. Environnement, Nature, Paysage.* doi:10.4000/cybergeo.22818
- Le Berre, S., Courtel, J., Brigand, L., 2010. Etude de la fréquentation nautique du Bassin d’Arcachon - Rapport final. Dir. régionale des Aff. Marit. Aquitaine – Serv. départemental Arcachon Géomer, Umr 6554 LETG – Univ. Bretagne Occident. 102.
- Legendre, Legendre, 1998. Numerical ecology. Transformation 1–4.
- Legoff, F., Bonnomet, V., 2004. Devenir et comportement des métaux dans l’ eau : biodisponibilité et modèles BLM Rapport technique Devenir et comportement des métaux dans l’ eau : biodisponibilité et modèles BLM Rapport technique. INERIS 87.
- Lehotay, S.J., Harman-fetcho, J.A., Mcconnell, L.L., 1998. Agricultural Pesticide Residues in Oysters and Water from Two Chesapeake Bay Tributaries 37, 32–44.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Lejart, M., 2009. Etude du processus invasif de *Crassostrea gigas* en Bretagne: Etat des lieux, dynamique et conséquences écologiques.
- Leverett, D., Thain, J., 2013. Oyster embryo-larval bioassay ( revised ), in: ICES TECHNIQUES IN MARINE ENVIRONMENTAL SCIENCES. p. 38.
- Lewbart, G.A., 2011. No Title, in: Invertebrate Medicine, 2nd Edition. p. 504.
- Liang Liang, Z., Hun Kim, Y., Feng Zhang, Z., Min Lim, S., Ho Kang, K., 2009. Water temperature and salinity tolerance of embryos and spat of the mussel, *Musculista senhousia*. Korean J.Malacol. 25, 179–187.
- Lin, H., Hsu, S., Hwang, P.P., 2000. Maternal transfer of cadmium tolerance in larval *Oreochromis mossambicus*. J. Fish Biol. 57, 239–249.
- Lindquist, S., Craig, E.A., 1988. The heat-shock proteins.
- Littaye, A., Dantas, M., Hubert, R., 2011. Projet de parc naturel marin sur le bassin d'Arcachon et son ouvert. Agence des aires Mar. protégées 152.
- Liu, H., Xiong, M., 2009. Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metolachlor to *Chlorella pyrenoidosa*. Aquat. Toxicol. 93, 100–106. doi:10.1016/j.aquatox.2009.04.006
- Liu, H., Ye, W., Zhan, X., Liu, W., 2006. A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 63, 451–455. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.02.002
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. Methods 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lough, R., Gonor, J., 1971. Early embryonic stages of *Adula californiensis* (Pelecypoda : Mytilidae) and the effect of temperature and salinity on developmental rate. Mar. Biol. 8, 118–125.
- Loureiro, S., Newton, A., Icely, J., 2006. Boundary conditions for the European Water Framework Directive in the Ria Formosa lagoon, Portugal (physico-chemical and phytoplankton quality elements). Estuar. Coast. Shelf Sci. 67, 382–398. doi:10.1016/j.ecss.2005.11.029
- Lucas, C.H., Horton, A.A., 2014. Short-term effects of the heavy metals, Silver and copper, on polyps of the common jellyfish, *Aurelia aurita*. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 461, 154–161. doi:10.1016/j.jembe.2014.08.003
- Luna-acosta, A., Renault, T., Thomas-guyon, H., Faury, N., Saulnier, D., Budzinski, H., 2012. Chemosphere Detection of early effects of a single herbicide ( diuron ) and a mix of herbicides and pharmaceuticals ( diuron , isoproturon , ibuprofen ) on immunological parameters of Pacific oyster ( *Crassostrea gigas* ) spat. Chemosphere 87, 1335–1340. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.02.022
- Luo, L., Ke, C., Guo, X., Shi, B., Huang, M., 2014. Metal accumulation and differentially expressed proteins in gill of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) exposed to long-term heavy metal-contaminated estuary. Fish Shellfish Immunol. 38, 318–329. doi:10.1016/j.fsi.2014.03.029
- MacInnes, J.R., Calabrese, a., 1979. Combined effects of salinity, temperature, and copper on embryos and early larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 8, 553–562. doi:10.1007/BF01055036
- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H., Morin, B., 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Mar. Pollut. Bull. 64, 2663–2670. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.10.009

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Mai, H., Gonzalez, P., Pardon, P., Tapie, N., Budzinski, H., Cachot, J., Morin, B., 2014. Comparative responses of sperm cells and embryos of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to exposure to metolachlor and its degradation products. *Aquat. Toxicol.* 147, 48–56. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.024
- Mai, H., Morin, B., Pardon, P., Gonzalez, P., Budzinski, H., Cachot, J., 2013. Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 89, 1–8. doi:10.1016/j.marenvres.2013.04.003
- Maniez, C., Laug, M., 2009. Captage du CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère, Ecole des Mines Douai.
- Manzo, S., Miglietta, M.L., Rametta, G., Buono, S., Di Francia, G., 2013. Embryotoxicity and spermotoxicity of nanosized ZnO for Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*. *J. Hazard. Mater.* 254-255, 1–7. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.03.027
- Mao, H., Wang, D.H., Yang, W.X., 2012a. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquat. Toxicol.* 110-111, 208–213. doi:10.1016/j.aquatox.2012.01.018
- Mao, H., Wang, D.-H., Yang, W.-X., 2012b. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquat. Toxicol.* 110-111, 208–213. doi:10.1016/j.aquatox.2012.01.018
- Marchand, M., Amouroux, I., Bédier, E., Belin, C., Claisse, D., Durand, G., Soudant, D., 2015. Qualité du Milieu Marin Littoral Synthèse Nationale de la Surveillance 2013- Edition 2015 1–60.
- Marie, V., Baudrimont, M., Boudou, A., 2006. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65, 609–617. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.01.074
- Marshall, D., 2008. Transgenerational plasticity in the sea: context-dependent maternal effects across the life history. *Ecology* 89, 418–427.
- Martin, M., Osborn, K.E., Billig, P., Glickstein, N., 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and Cancer magister larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 12, 305–308. doi:10.1016/0025-326X(81)90081-3
- Mason, R.P., 2013. Trace metals and organisms: Essential and toxic metals, organometallics, microbial processes, and metal bioaccumulation, in: *Trace Metals in Aquatic Systems*. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, UK. pp. 370–421. doi:10.1002/9781118274576
- Maurer, D., Auby, I., Moran, A., Barbier, C., Perrière-rumèbe, M., Tournaire, M.-P., Isabelle, A., Connes, C., 2011. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon - Année 2011. Ifremer (LER AR). 61.
- Maurer, D., Auby, I., Passoni, S., Méteigner, C., Rigouin, L., Perrière-Rumèbe, M., Tournaire, M.-P., 2013. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon Année 2013. Ifremer 60.
- May, P., May, E., 1999. Rôles de P53 dans le cycle cellulaire, l'apoptose et le cancer. *Rev. Française des Lab.* 342, 41–48. doi:10.1016/S0338-9898(99)80035-3
- Meresse, M., Frostin, G., 2012. Quel avenir pour la filière ostréicole dans les régions de la façade atlantique française ? *Cons. Econ. sociaux environnementaux l'Atlantique* 54.
- Mermet-Bouvier, C., 2006. Caractérisation d'un nouveau récepteur à dépendance : TrkC et étude de la signification biologique de la fonction pro-apoptotique de RET dans la tumorigenèse.
- Mileikovsky, S. a., 1973. Speed of active movement of pelagic larvae of marine bottom invertebrates

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l’impact de la pollution du Bassin d’Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- and their ability to regulate their vertical position. *Mar. Biol.* 23, 11–17. doi:10.1007/BF00394107
- Mille, D., Le Moine, O., 2011. Adaptabilités des activités conchyliques aux modifications de leur environnement : Scénarii et solutions. La cas du bassin de Marennes-Oléron.
- Miossec, L., Deuff, R.-M. LE, Goulletquer, P., 2009. Alien species alert : *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). *ICES Coop. Res. Rep.* 46.
- Moal, J., Lambert, C., Moullac, G. Le, Moal, J., Lambert, C., Moullac, G. Le, 2010. Le facteur de risque température.
- Mori, K., 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 53, 361–369. doi:10.1007/BF00391619
- Mori, R., Wang, Q., Danenberg, K.D., Pinski, J.K., Danenberg, P. V., 2008. Both  $\beta$ -actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate* 68, 1555–1560. doi:10.1002/pros.20815
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Dubreule, C., Serpentine, A., Lebel, J.M., Costil, K., 2014. Effects of acute exposures to mecoprop, mecoprop-p and their biodegradation product (2-MCP) on the larval stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 146, 165–175. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.008
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpentine, A., Lebel, J.M., Jha, A.N., Costil, K., 2013. Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 128-129, 67–78. doi:10.1016/j.aquatox.2012.12.002
- Mottin, E., Caplat, C., Latire, T., Mottier, A., Mahaut, M.L., Costil, K., Barillier, D., Lebel, J.M., Serpentine, A., 2012. Effect of zinc sacrificial anode degradation on the defence system of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Chronic and acute exposures. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 1911–1920. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.06.017
- Muñoz, I., Rosés, N., 2000. Comparison of extraction methods for the determination of atrazine accumulation in freshwater molluscs (*Physa acuta* Drap. and *Ancylus fluviatilis* Müll, Gastropoda). *Water Res.* 34, 2846–2848. doi:10.1016/S0043-1354(99)00394-2
- Nadella, S.R., Fitzpatrick, J.L., Franklin, N., Bucking, C., Smith, S., Wood, C.M., 2009. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossolus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 340–348. doi:10.1016/j.cbpc.2008.09.001
- Neves, M., Castro, B.B., Vidal, T., Vieira, R., Marques, J.C., Coutinho, J. a. P., Gonçalves, F., Gonçalves, a. M.M., 2015. Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecol. Indic.* 53, 220–230. doi:10.1016/j.ecolind.2015.01.031
- Newton, a., Icely, J.D., Falcao, M., Nobre, a., Nunes, J.P., Ferreira, J.G., Vale, C., 2003. Evaluation of eutrophication in the Ria Formosa coastal lagoon, Portugal. *Cont. Shelf Res.* 23, 1945–1961. doi:10.1016/j.csr.2003.06.008
- O’Connell, P.J., Harms, C.T., Allen, J.R.F., 1998. Metolachlor, S-metolachlor and their role within sustainable weed-management. *Crop Prot.* 17, 207–212. doi:10.1016/S0261-2194(98)80011-2
- O’Connor, W.A., Lawler, N.F., 2004a. Salinity and temperature tolerance of embryos and juveniles of the pearl oyster, *Pinctada imbricata* Röding. *Aquaculture* 229, 493–506. doi:10.1016/S0044-8486(03)00400-9

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l’impact de la pollution du Bassin d’Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- O’Connor, W.A., Lawler, N.F., 2004b. Salinity and temperature tolerance of embryos and juveniles of the pearl oyster, *Pinctada imbricata* Ro. *Aquaculture* 229, 493–506. doi:10.1016/S0044-8486(03)00400-9
- Of, S., Thesis, T.H.E., 2013. THESIS.
- Okamura, H., Aoyama, I., Liu, D., Maguire, R., Pacepavicius, G., Lau, Y., 2000. Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. *Water Res.* 34, 3523–3530.
- Orth, R.J., Carruthers, T.I.M.J.B., Dennison, W.C., Duarte, C.M., James, W., Jr, K.L.H., Hughes, A.R., Kendrick, G.A., Kenworthy, W.J., Olyarnik, S., Short, F.T., Waycott, M., Williams, S.L., 2006. Global Crisis for Seagrass Ecosystems - Done. *Bioscience* 56, 987–996.
- Ozoh, P.T., 1992. The effect of temperature and salinity on copper body-burden and copper toxicity to *Hediste* (*Nereis*) *diversicolor*. *Environ. Monit. Assess.* 21, 11–17.
- Park, M.S., Jo, P.G., Choi, Y.K., An, K.W., Choi, C.Y., 2009. Characterization and mRNA expression of Mn-SOD and physiological responses to stresses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol. Res.* 5, 451–461. doi:10.1080/17451000802626554
- Parker, L.M., Ross, P.M., O’Connor, W. a., 2010. Comparing the effect of elevated pCO<sub>2</sub> and temperature on the fertilization and early development of two species of oysters. *Mar. Biol.* 157, 2435–2452. doi:10.1007/s00227-010-1508-3
- Peake, E., Locke, J., Tierney, L., Kolok, A., 2004. Copper tolerance in fatheadminnows: II. Maternal transfer. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 208–211.
- Perdue, J.A., Beattie, J.H., Chew, K.K., 1981. Some relationships between Gametogenic Cycle and Summer Mortality Phenomenon in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. *J. Shellfish Res.* 1, 9–16.
- Pernet, F., Barret, J., Le Gail, P., Malet, N., Pastoureau, a, Munaron, D., De Lorgeril, J., Bachère, E., Vaquer, a, Huvet, a, Corporeau, C., Normand, J., Boudry, P., Moal, J., Quéré, C., Quilien, V., Daniel, J., Pépin, J., Saulnier, D., Gonzalez, J., Bouchouca, M., 2010. Mortalité du naissain d’Huître creuse *Crassostrea gigas* dans l’étang de Thau en 2009 96.
- Pernet, F., Barret, J., Le Gall, P., Franck, L., Fiandrino, A., Huvet, A., Cordporeau, C., Boudry, P., Quéré, C., Dégremont, L., 2011. Mortalités massives de l’Huître creuse : causes et perspectives Rapport final du programme de recherche sur les mortalités d’huîtres creuses *Crassostrea gigas* dans l’étang de Thau.
- Pesando, D., Robert, S., Huitorel, P., Gutknecht, E., Pereira, L., Girard, J.P., Ciapa, B., 2004. Effects of methoxychlor, dieldrin and lindane on sea urchin fertilization and early development. *Aquat. Toxicol.* 66, 225–239. doi:10.1016/j.aquatox.2003.09.007
- Peyrefitte, M., 1993. La dynamique spatio-économique du Bassin d’Arcachon. IFREMER 1–10. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Piano, A., Asirelli, C., Caselli, F., Fabbri, E., 2002. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress Chaperones* 7, 250–257. doi:10.1379/1466-1268(2002)007<0250:HEITSO>2.0.CO;2
- Piquet, J.-C., 2014. DOCUMENT DE PRESCRIPTION « SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE » INVENTAIRE CARTOGRAPHIQUE DES POINTS DE PRELEVEMENT REMI ET DES LISTES DE ZONES CLASSEES ET SURVEILLEES 33.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l’impact de la pollution du Bassin d’Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Plus, M., Dumas, F., Stanisière, J.-Y., Maurer, D., 2009. Hydrodynamic characterization of the Arcachon Bay, using model-derived descriptors. *Cont. Shelf Res.* 29, 1008–1013. doi:10.1016/j.csr.2008.12.016
- Plus, M., Maurer, D., Dumas, F., 2006. Caractérisation des composantes hydrodynamiques d’une lagune mésotidale, le Bassin d’Arcachon. PNEC – Chantier Littoral Atlantique : Mode de fonctionnement des systèmes semi-fermés du littoral Atlantique Thème 1 : Caractérisation des forçages hydrod. IFREMER 54.
- Pörtner, H.-O., Reipschlag, a, Heisler, N., 1998. Acid-base regulation, metabolism and energetics in *Sipunculus nudus* as a function of ambient carbon dioxide level. *J. Exp. Biol.* 201, 43–55.
- Pouvreau, S., Gangnery, A., Tiapari, J., Lagarde, F., Garnier, M., Bodoy, A., 2000. Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteriidae), cultivated in Takapoto atoll (French Polynesia). *Aquat. Living Resour.* 13, 37–48. doi:10.1016/S0990-7440(00)00135-2
- Pouvreau, S., Lepennec, M., 2006. Ecophysiologie de la reproduction chez l’huître creuse *Crassostrea gigas*.
- Przeslawski, R., Byrne, M., Mellin, C., 2015. A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. *Glob. Chang. Biol.* 21, 2122–2140. doi:10.1111/gcb.12833
- Quiniou, F., Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Geffard, a, Mouneyrac, C., Budzinski, H., Romeo, M., 2007. Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. *Env. Int* 33, 27–33. doi:S0160-4120(06)00097-3 [pii] 10.1016/j.envint.2006.06.020
- Quiniou, F., His, E., Delesmont, R., Caisey, X., 2005. Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux: bio-essai “développement embryon-lavaire de bivalve,” Méthodes d’analyse en milieu marin.
- Quiniou, F., Toularastel, F., LeFevre-Lehoerff, G., 1991. Utilisation des bioessais sur les embryons de bivalves dans le cadre d’une surveillance des effets biologiques. IFREMER 22.
- Ramachandran, S., Patel, T.R., Colbo, M.H., 1997. Effect of copper and cadmium on three *Malaysian tropical* estuarine invertebrate larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 36, 183–188. doi:10.1006/eesa.1996.1508
- Range, P., Pilo, D., Ben-Hamadou, R., Chicharo, M., Matias, D., Joaquim, S., Oliveira, A., Chicharo, L., 2012. Seawater acidification by CO<sub>2</sub> in a coastal lagoon environment: Effects on life history traits of juvenile mussels *Mytilus galloprovincialis*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 424, 89–98.
- Rice, C.P., Nochetto, C.B., Zara, P., 2002. Volatilization of Trifluralin, Atrazine, Metolachlor, Chlorpyrifos, -Endosulfan, and â-Endosulfan from Freshly Tilled Soil. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4009–4017.
- Richardson, B.J., Mak, E., De Luca-Abbott, S.B., Martin, M., McClellan, K., Lam, P.K.S., 2008. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels “integrate” biomarker responses? *Mar. Pollut. Bull.* 57, 503–514. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.02.032
- Ringwood, A.H., 1992. Comparative sensitivity of gametes and early developmental stages of a sea urchin species (*Echinometra mathaei*) and a bivalve species (*Isognomon californicum*) during metal exposures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 288–295. doi:10.1007/BF00212088
- Ringwood, A.H., Brouwer, M., 1995. Patterns of metallothionein expression in oyster embryos. *Mar.*



Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Environ. Res. 39, 101–105. doi:10.1016/0141-1136(94)00042-N
- Rivard, L., 2003. Environmental Fate of Metolachlor. Environ. Monit. Branch Dep. Pestic. Regul. 14.
- Robert, R., His, E., 1981. Action de 1 1 acetate de tributyle -étain sur les oeufs et les larves D de deux mollusques d 'intérêt commercial : *Crassostrea Rigas* (Thunberg ) et *Hytillus galloprovincialis* (Lmk). Com. la Maric. 42, 1–16.
- Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals 22.
- Rollin, C., Quiot, F., 2006. Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines, Rapport INERIS-DRC. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Ruesink, J.L., Hunter, S.L., Trimble, A.C., KimberlyW. Heiman, FiorenzaMicheli, J.E.B., Kay, and M.C., 2005. INTRODUCTION OF NON-NATIVE OYSTERS: Ecosystem Effects and Restoration Implications.
- Ruttkey-Nedecky, B., Nejd, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R., 2013. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. Int. J. Mol. Sci. 14, 6044–6066. doi:10.3390/ijms14036044
- Salvo, F., 2010. Approche comparée des populations naturelles et cultivées d'huître japonaise *Crassostrea gigas* dans une lagune macro-tidale (Bassin d'Arcachon) : cycle biologique, relations trophiques et effets sur le benthos 4, 510.
- Schroeder, H. a, Nason, a P., Tipton, I.H., Balassa, J.J., 1966. Essential trace metals in man: copper. J. Chronic Dis. 19, 1007–1034. doi:10.1016/0021-9681(70)90056-1
- Scourzic, T., Loyen, M., Fabre, E., Tessier, A., Dalias, N., Trut, G., Maurer, D., Simonnet, B., 2011. Evaluation du stock d'huîtres sauvages et en élevage dans le Bassin d'Arcachon.
- Shi, Y., 2002. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. Mol. Cell 9, 459–470. doi:10.1016/S1097-2765(02)00482-3
- Shine, J.P., Wallace, G.T., 1995. the Formation of Surface-Active Organic-Complexes of Copper in Coastal Marine Waters. Mar. Chem. 51, 145–157. doi:10.1016/0304-4203(95)00050-2
- SIBA, 2013. Rapport annuel 2013 sur le prix et la qualité des services publics de l'assainissement collectif et non collectif 112.
- Song, Y.P., Suquet, M., Quéau, I., Lebrun, L., 2009. Setting of a procedure for experimental fertilisation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. Aquaculture 287, 311–314. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.018
- Srinivasan, M., Swain, G.W., 2007. Managing the Use of Copper-Based Antifouling Paints. Environ. Manage. 39, 423–441. doi:10.1007/s00267-005-0030-8
- Suquet, M., Amourda, C., Mingant, C., Quéau, I., Lebrun, L., Brizard, R., 2007. Setting of a procedure for experimental incubation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. Aquaculture 273, 503–508. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.018
- Suquet, M., Mercier, A. Le, Rimond, F., Mingant, C., Haffray, P., Labbe, C., Iroise, T.B., 2012. Setting tools for the early assessment of the quality of thawed Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) D-larvae. Theriogenology 78, 462–467.
- Tagu, D., Moussard, C., 2003. Principes des techniques de biologie moléculaire, in: Principes Des Techniques de Biologie Moléculaire. p. 176.
- Tettlebach, S.T., Rhodes, E.W., 1981. Combined effects of temperature and salinity on embryos and

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- larvae of the Northern Bay scallop *Argopecten irradians irradians*. *Mar. Biol.* 63, 249–256.
- Thakkar, M., Randhawa, V., Wei, L., 2013. Comparative responses of two species of marine phytoplankton to metolachlor exposure. *Aquat. Toxicol.* 126, 198–206. doi:10.1016/j.aquatox.2012.10.002
- Thiyagarajan, V., Ko, G.W.K., 2012. Larval growth response of the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*) to multiple climate change stressors. *Aquaculture* 370-371, 90–95. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.09.025
- Thomas-Guyon, H., Gagnaire, B., Bado-Nilles, A., Bouilly, K., Lapègue, S., Renault, T., 2009. Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Dev. Comp. Immunol.* 33, 653–659. doi:10.1016/j.dci.2008.11.011
- Trenkamp, S., Martin, W., Tietjen, K., 2004. Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty acid elongases from *Arabidopsis thaliana* by different herbicides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11903–11908. doi:10.1073/pnas.0404600101
- Turner, A., 2010. Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 159–171. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.12.004
- Untersee, S., Pechenik, J.A., 2007. Local adaptation and maternal effects in twospecies of marine gastropod (*Crepidula*) that differ in dispersal potential. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 347, 79–85.
- Van der Werf, H.M.G., 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agric. Ecosyst. Environ.* 60, 81–96.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, 1–12. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Ventura-Lima, J., Sandrini, J.Z., Cravo, M.F., Piedras, F.R., Moraes, T.B., Fattorini, D., Notti, A., Regoli, F., Geracitano, L. a., Marins, L.F.F., Monserrat, J.M., 2007. Toxicological responses in *Laeonereis acuta* (*annelida, polychaeta*) after arsenic exposure. *Environ. Int.* 33, 559–564. doi:10.1016/j.envint.2006.09.016
- Verkhovskiy, M.I., Belevich, I., Bloch, D. a., Wikström, M., 2006. Elementary steps of proton translocation in the catalytic cycle of cytochrome oxidase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1757, 401–407. doi:10.1016/j.bbabi.2006.05.026
- Verween, a., Vincx, M., Degraer, S., 2007. The effect of temperature and salinity on the survival of *Mytilopsis leucophaeata* larvae (*Mollusca, Bivalvia*): The search for environmental limits. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 348, 111–120. doi:10.1016/j.jembe.2007.04.011
- Viarengo, A., Accomando, R., Ferrando, I., Beltrame, F., Fato, M., Marcenaro, G., 1996. Heavy metal effects on cytosolic free Ca<sup>2+</sup> level in the marine protozoan *Euplotes crassus* evaluated by confocal laser scanning microscopy. *Comp. Biochem. Physiol. C-Pharmacology Toxicol. Endocrinol.* 113, 161–168.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 146, 281–300. doi:10.1016/j.cbpc.2007.04.011
- Waddington, C., 1942. Canalisation of development and the inheritance of acquired characters. *Group* 563–565.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Waeles, M., Riso, R.D., Cabon, J.Y., Maguer, J.F., Lapos;Helguen, S., 2009. Speciation of dissolved copper and cadmium in the Loire estuary and over the North Biscay continental shelf in spring. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84, 139–146. doi:10.1016/j.ecss.2009.06.011
- Ward, L.G., Kemp, W.M., Boyton, W.R., 1984. The influence of waves and seagrass communities on suspended particulates in an estuarine embayment. *Mar. Geol.* 59, 85–103. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Warner, K., Frankel, E., 1987. Effects of B-Carotene on light stability of soybean oil 64, 213–218.
- Watermann, B.T., Herlyn, M., Daehne, B., Bergmann, S., Meemken, M., Kolodzey, H., 2008. Pathology and mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in 2005 at the East Frisian coast, Germany. *J. Fish Dis.* 31, 621–630. doi:10.1111/j.1365-2761.2008.00953.x
- Waycott, M., Duarte, C.M., Carruthers, T.J.B., Orth, R.J., Dennison, W.C., Olyarnik, S., Calladine, A., Fourqurean, J.W., Heck, K.L., Hughes, Ar., Kendrick, G.A., Kenworthy, Wj., Short, F.T., Williams, S.L., 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 12377–12381. doi:10.1073/pnas.0905620106
- Weisshaar, H., Böger, P., 1987. Primary effects of chloroacetamides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 28, 286–293. doi:10.1016/0048-3575(87)90027-7
- Weisshaar, H., Retzlaff, G., Ger, P.B., 1988. Chloroacetamide Inhibition of Fatty Acid Synthesis Chloroacetamides are an established preemergent herbicide class ; their mode of action , however , has still to be elucidated . Cell metabolism is generally disturbed , and the most pronounced effects are 216, 212–216.
- Weng, N., Wang, W., 2014a. Improved tolerance of metals in contaminated oyster larvae. *Aquat. Toxicol.* 146, 61–69. doi:10.1016/j.aquatox.2013.10.036
- Weng, N., Wang, W.X., 2014b. Improved tolerance of metals in contaminated oyster larvae. *Aquat. Toxicol.* 146, 61–69. doi:10.1016/j.aquatox.2013.10.036
- Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., Akcha, F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[alpha]pyrene, 17 alpha-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.* 85, 133–142. doi:DOI 10.1016/j.aquatox.2007.08.007
- Wisely, B., Blick, R., 1967. Mortality of marine invertebrate larvae in mercury, copper, and zinc solutions. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 18, 63 – 72.
- Wolins, N.E., Brasaemle, D.L., Bickel, P.E., 2006. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett.* 580, 5484–5491. doi:10.1016/j.febslet.2006.08.040
- Wu, S., Lin, H., Yang, W., 2008. The effects of maternal Cd on the metallo-thionein expression in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae. *Aquat. Toxicol.* 87, 296–302.
- Xu, D., Wen, Y., Wang, K., 2010. Effect of chiral differences of metolachlor and its (S)-isomer on their toxicity to earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1925–1931. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.07.035
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo,

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54. doi:10.1038/nature11413

Zhang, Z., Xiaoxu, L., Vandeppeer, M., Zhao, W., 2006. Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256, 502–509.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

**Annex**

**Annex 1 :**

*Table 1: Limit of detection (LD) and limit of quantification (LQ) in ng.L<sup>-1</sup> of the protocol for each compound follows in oyster matrixes in 2013*

<b>Compound</b>	<b>LD</b>	<b>LQ</b>	<b>Compound</b>	<b>LD</b>	<b>LQ</b>
124 DCPU	1.3	3.8	flazasulfuron	1.0	3.1
134 DCPU	1.3	4.0	fluazifop-p-butyl	0.3	0.8
1343 DCPMU	9.9	29.8	flusilazole	1.9	5.7
acetochlor	28.2	84.5	hexazinone	0.3	0.8
acetochlor ESA	3.5	10.4	hydroxy simazine	0.8	2.4
acetochlor OA	4.4	13.1	imidacloprid	0.5	1.6
alachlor	1.8	5.5	irgarol	0.1	0.3
amethryn	0.2	0.7	isoproturon	0.2	0.5
atrazine	1.2	3.7	linuron	1.6	4.7
atrazine 2 hydroxy	0.9	2.6	metazachlor	0.3	1.0
azoxystrobine	0.4	1.2	methiocarb	0.2	0.6
bentazone	45.0	135.1	metolachlor	1.0	3.1
carbendazime	0.2	0.7	metolachlor ESA	1.6	4.9
carbetamide	0.3	0.9	metolachlor OA	1.4	4.2
carbofuran	2.3	6.8	metsulfuron-methyl	0.2	0.7
carbosulfan	0.6	1.7	nicosulfuron	1.0	3.0
chlorotoluron	0.4	1.3	promethryn	0.2	0.5
chlorsulfuron	1.3	4.0	propachlor	1.8	5.5
cyanazine	0.1	0.3	propiconazole	0.8	2.5
cyromazine	0.5	1.6	prosulfuron	1.6	4.7
DEA	4.6	13.9	pymethroline	0.6	1.7
DIA	2.3	6.9	simazine	1.7	5.2
diflufenican	0.7	2.1	terbutryn	0.1	0.3
dimetachlor	1.4	4.2	terbutylazine	0.4	1.2
diuron	2.0	5.9	terbutylazine desethyl	0.6	1.9
DMSA	0.5	1.5	thiamethoxan	0.2	0.7
DMST	0.5	1.4			

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

Tableau 2 : Limit of detection (LD) and limit of quantification (LQ) in ng.L<sup>-1</sup> of the protocol for each compound follows in oyster matrix in 2014

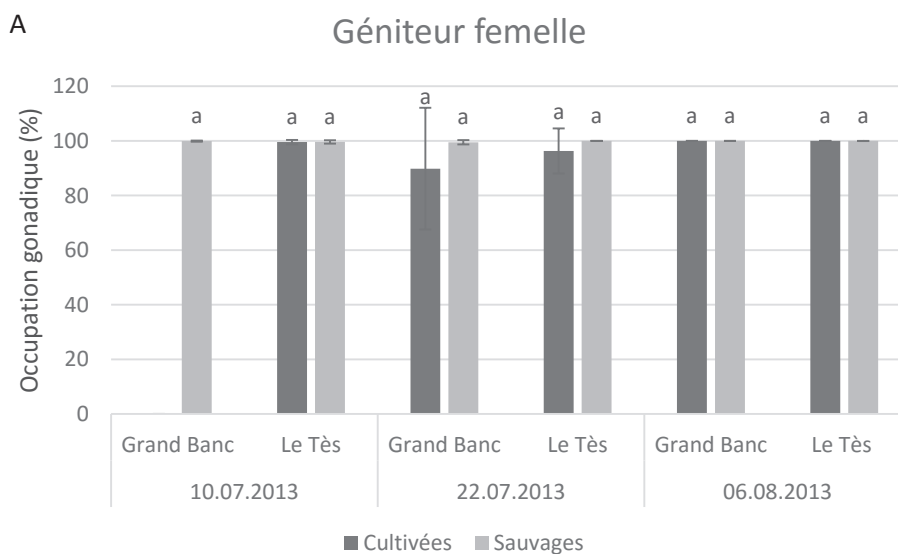
Compound	LD	LQ	Compound	LD	LQ
124 DCPU	6.1	18.4	flazasulfuron	0.6	1.8
134 DCPU	1.5	4.4	fluazifop-p-butyl	0.2	0.6
1343 DCPMU	9.8	29.5	flusilazole	2.5	7.4
acetochlor	16.8	50.5	hexazinone	0.3	0.9
acetochlor ESA	2.2	6.7	hydroxy simazine	3.5	10.4
acetochlor OA	4.5	13.4	imidacloprid	0.3	0.9
alachlor	0.8	2.3	irgarol	0.1	0.4
amethryn	0.3	1.0	isoproturon	0.1	0.4
atrazine	1.2	3.7	linuron	2.1	6.4
atrazine 2 hydroxy	0.6	1.8	metazachlor	0.5	1.4
atrazine d5	4.3	12.9	methiocarb	0.2	0.5
azoxystrobine	0.3	0.9	metolachlor	0.3	0.8
bentazone	6.8	20.4	metolachlor ESA	1.9	5.7
carbendazime	0.4	1.3	metolachlor OA	1.4	4.2
carbetamide	0.2	0.7	metsulfuron-methyl	0.2	0.7
carbofuran	0.1	0.3	nicosulfuron	0.2	0.6
carbosulfan	0.6	1.8	promethryn	0.2	0.6
chlorotoluron	1.1	3.3	propachlor	0.9	2.6
chlorsulfuron	1.2	3.7	propiconazole	1.1	3.3
cyanazine	0.1	0.3	prosulfuron	1.7	5.1
cyromazine	1.1	3.4	pymethroline	4.0	12.1
DEA	1.3	3.8	quizalofop-p-tefuryl	2.0	5.9
DIA	1.5	4.4	simazine	1.2	3.6
diflufenican	1.0	3.0	terbutryn	0.1	0.3
dimetachlor	0.8	2.4	terbutylazine	0.5	1.6
diuron	1.1	3.4	terbutylazine desethyl	1.2	3.6
DMSA	0.4	1.1	thiamethoxan	0.2	0.7
DMST	0.3	0.9			

## 2. Essai préliminaire

En 2013, des prélèvements d’huîtres ont été réalisés pendant la période de reproduction afin de réaliser un examen histologique des gonades. L’objectif est d’étudier l’état de maturation de la gonade en fonction des sites d’étude, des dates de prélèvement, mais aussi en fonction de leur mode de vie. Pour cela 5 huîtres sauvages et cultivées ont été prélevées en 2013 au niveau des deux sites où a été menée l’étude d’embryo-toxicité : Le Tès et Comprian. Les mesures obtenues pour les 5 individus différents ont été moyennées.

### Résultats

Les résultats ne montrent pas de différence significative du pourcentage d’occupation gonadique quel que soit le site, la date de prélèvement ou le mode de vie des huîtres (sauvages ou cultivées), ceci aussi bien pour les huîtres mâles que pour les huîtres femelles (Figure 49). De façon générale, le pourcentage d’occupation gonadique est compris entre 80 et 100 %.



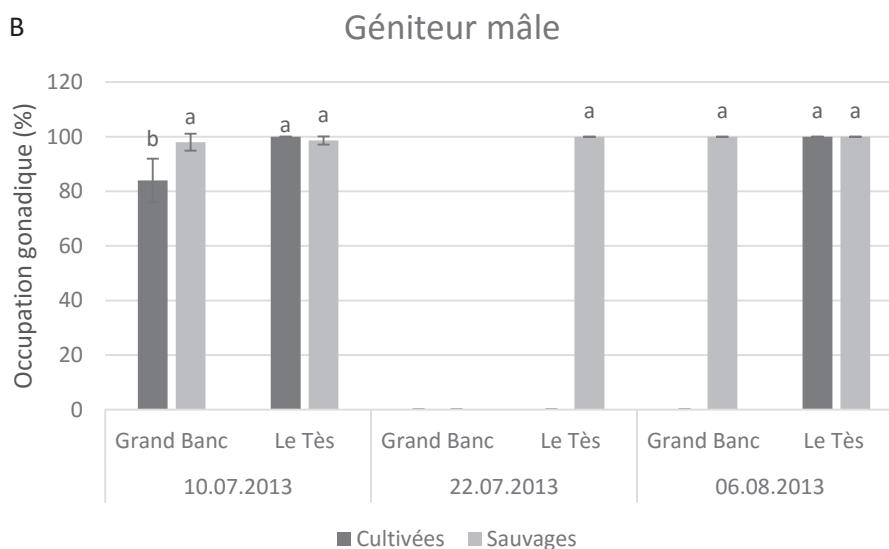


Figure 49 : Pourcentage d'occupation gonadique (%) pendant la période de reproduction pour les huîtres cultivées et sauvages provenant du Tès ou de Grand Banc en 2013, pour des géniteurs femelles (A) ou mâles (B).

### Discussion

Les résultats ne montrent pas de différence significative du pourcentage gonadique que ce soit en fonction des sites de prélèvements, du mode de vie (cultivée ou sauvage) ou encore au cours du temps, ceci aussi bien pour les huîtres mâles que pour les huîtres femelles (Figure 49). Dans le Bassin d'Arcachon, les huîtres présentent une saison de reproduction allant de début juin à mi-septembre (His, 1976). Ainsi à la fin de l'automne, et donc une fois la saison de reproduction terminée, la gonade présente une activité réduite, ceci, jusqu'au printemps suivant, où différentes phases vont se succéder, permettant d'assurer une nouvelle saison de reproduction. Vers mars avril, la gamétogénèse redevient active. C'est alors que débute une accumulation de glucides. Ceux-ci seront par la suite transformés en lipides de réserves des gamètes. Le contenu maximal en glucides est atteint au mois de mai et c'est environ un mois après qu'est observée le pic lipidique (Maurer et al., 2011). Selon les conditions environnementales, la maturité sexuelle maximum est atteinte entre mai et juillet. C'est ensuite que débutera la ponte. Les coupes de gonades ayant commencé en juin, il apparaît donc que la maturité sexuelle était déjà atteinte à cette date, le pourcentage gonadique étant compris entre 80 et 100 %. Il a donc été décidé, pour les prélèvements de l'été 2014, de réaliser les coupes histologiques en amont de la période de reproduction.



**3. Article 4 : Effets du cuivre et du S-métolachlore sur les capacités de fécondation et le développement embryo-larvaire : étude des réponses génétique, histologique et toxicologique de l'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas***

Dans cet article, l'huître creuse *C. gigas* a été étudiée au stade adulte et au stade embryo-larvaire (larves D). L'état de maturation des gonades, d'huîtres sauvages et cultivées prélevées en différents sites de la baie, a été observé avec des analyses histologiques avant la période de reproduction. Un des objectifs de ce travail est d'étudier l'impact de deux polluants : le cuivre et le S-métolachlore sur les capacités de fécondation des produits sexuels. Pour cela, après émission des gamètes, spermatozoïdes et ovules sont exposés à des concentrations en cuivre de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  et des concentrations en S-métolachlore de  $100 \text{ ng.L}^{-1}$ . Le pourcentage de cellules ayant atteint le stade de développement 2/4 cellules est ensuite dénombré. Les niveaux d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial, le stress oxydatif, la détoxification, la biotransformation, l'apoptose, la réponse à un choc thermique ou le métabolisme des lipides ont été caractérisés chez les larves d'huître lors d'expositions à des concentrations environnementales de cuivre ou S-métolachlore. Les résultats n'ont pas montré de différence dans le pourcentage d'occupation gonadique avant la période de reproduction, laissant suggérer que l'état de maturation des gamètes eux-mêmes serait à étudier. De plus, une exposition préalable des gamètes aux deux polluants étudiés n'a pas d'effet sur leur capacité de fécondation tout ou moins jusqu'au stade 2/4 cellules. Enfin, l'étude génétique a permis de révéler les capacités des larves D à réagir contre la contamination en cuivre ou en métolachlore par induction de divers mécanismes de défense, et particulièrement chez les larves issues des huîtres sauvages. De plus, les larves issues des huîtres prélevées proches de l'apport des tributaires répondent de manière plus importante que les huîtres proches de l'ouverture sur l'océan par induction de différents gènes impliqués dans la détoxification, le métabolisme mitochondrial, le stress oxydatif ou encore le métabolisme des lipides.

*Effects of copper and S-metolachlor on fertilization success and D-larvae development of the Pacific oyster native from the Arcachon bay*

Perrine Gamain<sup>1</sup>, Patrice Gonzalez<sup>1</sup>, Nicolas Mazzella<sup>2</sup>, Guillemine Daffe<sup>1</sup>, Jérôme Cachot<sup>1</sup>,  
Bénédicte Morin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univ. Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

<sup>2</sup> IRSTEA, URRBEX (Water research Unit), 50 avenue de Verdun, Gazinet, 33612 Cestas Cedex France

**Abstract**

Marine invertebrates are often exposed to pesticide contamination. Those environmental stresses experiences by parents could make a difference in gene expression patterns of the offspring. In this study the expressions levels of genes involved in mitochondrial metabolism, oxidative stress, detoxification, biotransformation, apoptosis, response to thermal shock or lipid metabolism are characterized in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* during exposures to environmental concentrations of copper or S-metolachlor. These two pollutants were selected because of their presence in the water of the Arcachon Bay. The percentage of gonadal occupation was studied during oyster breeding period. There is no impact of copper and S-metolachlor on the capacity of gametes to begin fecundation. Gene expression levels analysis showed the capacity of D-larvae to react against copper and S-metolachlor concentrations with higher capacity of wild D-larvae in comparison to cultivated D-larvae. D-larvae derived from genitors located within the bay induced more genes than those of the oceanic side.

**Key words:** Pacific oyster, pollutants, embryotoxicity, genetic, fertilization success

## 1. Introduction

Marine invertebrates tolerate a remarkable array of natural stresses (Hamdoun et al., 2003a). However, these stresses, and in particular pollution, can increase due to anthropogenic activities. Among pollutants, pesticides are commonly used throughout the world in agriculture or as antifouling biocides in paint formulations (Okamura et al., 2000). France is Europe's leading consumer of agrochemical substances (UIPP, 2006). Because of the extensive use of pesticides for pest control, they are frequently detected in soils and waters in the environment. Indeed, although the application of plant protection products occurs in the terrestrial environment, the ultimate receptors of many of these xenobiotics are the aquatic ecosystems (Neves et al., 2015). S-metolachlor, 2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-[(1S)-2-methoxy-1-methylethyl] acetamide, is one of the most studied active ingredient recovered in herbicide, and this compound is described as a potential danger to the environment and aquatic ecosystems (Liu et al., 2006). It is a component of many herbicides and its use is still authorized by most of the countries in the European Union (Regulation no. 540/2011). In the Arcachon bay, the activity of agriculture mainly dominates a watershed of 4138 km<sup>2</sup> (Auby and Maurer, 2004a). Due to several rivers draining the watershed, the pesticide contamination in the bay is widely dominated by this chloroacetanilide herbicide, and its metabolites (Auby et al., 2007; Budzinski et al., 2011). Indeed, S-metolachlor is detected at around 10 ng.L<sup>-1</sup> in seawater. Among the several pollutants that can contribute to aquatic pollution, heavy metals (e.g. copper) represent one of the most widespread and serious form of environmental contamination (Devi et al., 1996). Moreover, copper (Cu) is among the most dangerous metal for bivalve larvae (His et al., 1999). Throughout the world, Cu is widely used as component of antifouling paint (Turner, 2010). The Cu means concentrations in seawater of the Arcachon bay was from 0.6 to 4 µg.L<sup>-1</sup> during oyster breeding period (Gamain et al., 2016b). Since 2000s, Cu bioaccumulation increased significantly in tissues of oysters from the Arcachon Bay with concentrations up to more 400 mg/kg dry weight. In recent years, there have been numerous reports on the toxic effects of heavy metals and pesticides on marine invertebrates (Oyster: Akcha et al., 2012; Beiras and Albentosa, 2004; His et al., 1999, 1996; Lehotay et al., 1998; Mai et al., 2014, 2013; Mottier et al., 2013; Weng and Wang, 2014; Wessel et al., 2007 - Cray fish : Cook and Moore, 2008 - Mussel : Fitzpatrick et al., 2008; Nadella et al., 2009 - Jellyfish : Lucas and Horton, 2014 - Sea urchin : Ringwood, 1992 - Microorganism : Echeverrigaray et al., 1999; Liu et al., 2006; Neves et al., 2015). Physiological responses to environmental stressors may induce changes in gene expression levels as part of an organism's homeostatic mechanisms (Galay-Burgos et al., 2003). That's why, gene expression patterns are being increasingly used to identify exposure to stressful environmental conditions. In aquatic environments, they are used to examine how organisms respond to toxicants.

They also represented early and sensitive tools to detect sublethal stress that can lead to environmental degradation (Adams et al., 1989). However, to our knowledge, only few papers have investigated molecular responses in terms of gene expression in oyster D-larvae exposed to pollutants (Of and Thesis, 2013). Moreover, relevant studies on marine bivalves are very limited especially for the field populations (Damiens et al., 2006; Weng and Wang, 2014b). However, environmental stress experienced by genitors will lead to a considerable difference in the response of their offspring (Damiens et al., 2006; Marshall, 2008; Weng and Wang, 2014b). In this way, recent studies highlights that the carry-over effect from adult to offspring can provide resistance to the offspring when they are again exposed to metal stress (Damiens et al., 2006; Lin et al., 2000; Peake et al., 2004; Untersee, S., Pechenik, 2007; Weng and Wang, 2014b; Wu et al., 2008). In the present work, the expression levels of twenty genes was investigated on D-larvae obtained from wild and cultivated oysters native from the Arcachon bay harvested in the field at different time during the breeding period. To obtain more relevant information about the potential impact of contaminants on the fecundation process, experimentation was done on sperms and oocytes. The spawning capacities of genitors was also investigated by a histological study of the gonads.

## 2. Materials and methods

The effect of pollutants on the development of D-larvae (i.e 1 day old larvae) from different site in the Arcachon Bay and different sampling date was investigated. The embryo-toxic effects were examined through standardized acute 24h tests (AFNOR, 2009).

### 2.1. Brood stock

Wild and cultivated oysters (*C. gigas*, Thunberg, 1793) were collected at two contrasting sites (with different mass of water): "Comprian" and "Les Jacquets" in 2014 (Fig.1). Different sampling dates have been conducted annually during oysters breeding period from June to August. Oysters were acclimated at 12 ° C overnight in seawater site with airstone to oxygenate the water. Natural seawater was collected in the Arcachon Bay (SW France) near the Banc d'Arguin which is a location diluted by ocean contribution (Fig.1) and evidenced as poorly contaminated by heavy metals and pesticides. Immediately after sampling, seawater was filtered using membrane filter of 0.45 µm and then 0.2 µm (Xilab) to eliminate debris and microorganisms. Filtered seawater (FSW) was stocked at 4 °C in the dark and was used within 3 days. A few hours before experiment, FSW was filtered again at 0.2 µm. This reference water was chemically analyzed for pollutant concentrations determination.

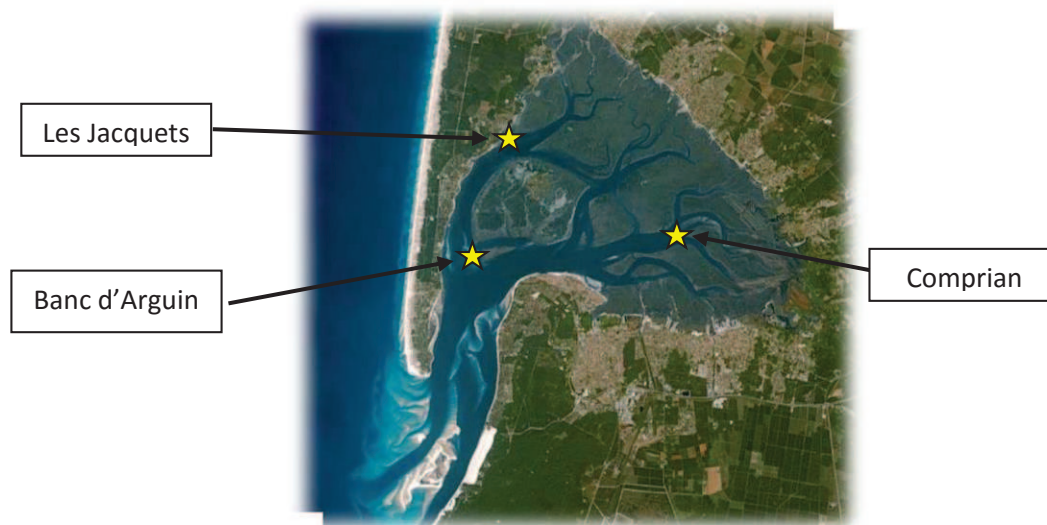


Figure 1: Sampling site in the Arcachon Bay (SW France)

## 2.2 Spawning and fertilization

No couple has been obtained by thermal stimulation. Consequently, gametes were obtained by stripping the gonad. For that, gonad was isolated from the rest of the body, put into a beaker with 0.2  $\mu\text{m}$  FSW and then pressed gently to bring out the mature gametes controlled under microscope. Eggs and sperm from two individuals were selected to give a single pairing. Sperms and eggs were sieved separately through a 50  $\mu\text{m}$  and 100  $\mu\text{m}$  meshes (Sefar Nitex), respectively to eliminate debris and feces. Sperm mobility was checked and the number of eggs was counted under microscope (LEICA DME) at a magnification of 100. Eggs were fertilized with sperm in ratio of 1:10 (egg:sperm) homogenizing with an agitator to prevent polyspermy. Fertilization success was verified under microscope, and embryos were then counted. Around 500 000 embryos of only one couple were transferred to 3L FSW containers. Control conditions were studied as well as contamination conditions at environmental concentrations: 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  of Cu or 100  $\text{ng.L}^{-1}$  of S-metolachlor. Water aliquots were collected to measure contaminant concentration at the beginning (T0h) and the end of the experiment (T24h). Embryos were incubated at 24 °C for 24 h in the dark, which are ideal time and temperature for D-larvae development (AFNOR,2009; Gamain et al., 2016; His et al., 1997).

After 24 hours of incubation, a water sample was taken to ensure the presence of D-larvae. The water was then filtered through 40 $\mu\text{m}$  in order to retain D-larvae. The filter was rinsed with FSW and larvae were collected in a 50mL tube. 5 aliquots of about 30 000 individuals were taken for genetic studies. Tubes were centrifuged, the supernatant discarded and the pellet suspended with 500 $\mu\text{L}$  of RNA Later

before being transferred into 1.5 ml Eppendorf. The samples were stored at - 80 ° C until total RNA extraction.

## **2.3 Genetic study**

### **2.3.1 Extraction of total RNA**

Total RNAs were extracted from 30 000 embryos (n=5 for each exposure condition) using the « SV Total RNA Isolation System » kit (Promega), according to manufacturer's recommendations.

### **2.3.2 Retro-transcription**

RT was performed using the kit « GoScript Reverse Transcription System » (Promega). Briefly, 10 µL of total RNA (around 3 µg) was mixed with 1µL of an oligo dT solution [1 µM] and 1 µL of an hexanucleotides solution [1 µM]. Samples were placed in a thermocycler (Eppendorf Mastercycler) for 5 min at 70 ° C and then 5 min at 4 ° C to linearize RNAs and allow primers to fix. Then, 8 µL of a mixture containing: 1 µL of reverse transcriptase [1U /µL], 4 µL of GoScript 5x reaction buffer, 1.5 µL of MgCl<sub>2</sub> [25mM], 1 µL of PCR Nucleotide Mix [10 mM] and 0.5 µL of Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor, were added to each tube and homogenized. The samples were then placed in the thermocycler for 5 min at 25 ° C, followed by 1h at 42 ° C. The cDNA were stored at -20 ° C until their used in real-time quantitative PCR reactions.

### **2.3.3 PCR-quantitative real-time**

Differential expression of studied genes was performed with an Mx3000P (Stratagene) following the manufacturer's instructions. Primer-sequences and functions for all the nineteen target genes and the three housekeeping genes used are reported in Table 1. Each PCR reaction was performed in 96 well plates, and included 17 µL of reaction mix (10 µL of Tp 2X (Syber green, *Taq* polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>), and 7µL H<sub>2</sub>O), 2 µL of specific primer-pairs (2 µM each) and 1µL of cDNA. The program began with an activation of the enzyme (95 ° C for 10 min) followed by 40 cycles of PCR: 95 ° C 30s, 55 ° C 30s, 72 ° C 30s. The quality of the amplification products was checked by analysis of thermal melting curves, conducted by gradually increasing the temperature from 60 to 95 ° C. The expression level of each gene was normalized according to reference gene mean value (*β-actin*, *ef1* and *rpl7*) using the 2<sup>-ΔCt</sup> method described by Livak and Schmittgen (2001).

Tableau 1 : Specific primer-pairs and functions of the different genes used

Gene	Sequence 5'-3'	Function
<i>β-actin</i>	AGTACCCATTGAACACGG <sup>a</sup> TGGCGGGAGCGTTGAA <sup>b</sup>	Cytoskeletal gene (housekeeping gene)
<i>ef1α</i>	AGAATGGATATGCGCCTGT <sup>a</sup> GCCACGGTCTGCCTCA <sup>b</sup>	Elongation factor (housekeeping gene)
<i>rpL7</i>	ACACCTCGGACGCTTT <sup>a</sup> GCTGTCTTCACGCAGGC <sup>b</sup>	Ribosomal protein (housekeeping gene)
<i>12S</i>	CTCAGTCTTGC GGGAGG <sup>a</sup> GGTTATGCGGAACCGCC <sup>b</sup>	Mitochondrial metabolism
<i>coxI</i>	GTGCCAACTGGTATTAAGGTGT <sup>a</sup> ACACCGCACCCATTGAT <sup>b</sup>	Mitochondrial metabolism
<i>Sod Mn</i>	ACAAAGTCAATCAGTGCCCT <sup>a</sup> CCATTGCCTCTGCCAGT <sup>b</sup>	Oxidative stress response
<i>sod Cu/Zn</i>	CCAGAGGATCACGAGAGGC <sup>a</sup> GCGTTTCCGGTCGTCTT <sup>b</sup>	Oxidative stress response
<i>cat</i>	GTCGTGCCCTTTACAACC <sup>a</sup> CGCCCGTCCGAAGTTT <sup>b</sup>	Oxidative stress response
<i>gpx</i>	ATCGAACGCTGCACCA <sup>a</sup> AGCTCCGTCTGCATTGT <sup>b</sup>	Oxidative stress response
<i>mt1</i>	TGTCTGCTCTGATTCGTGTCCAGC <sup>a</sup> GGTCCTTTGTTACACGCACTCATT <sup>b</sup>	Detoxification
<i>mt2</i>	TCCGGATGTGGCTGCAAAGTCAAG <sup>a</sup> GGTCCTTTGTTACACGCACTCATT <sup>b</sup>	Detoxification
<i>hsp70</i>	CGACAATAGAATGGTCAATCACTTT <sup>a</sup> GCTCGTGTGATTTTGCTGTAG <sup>b</sup>	Response to thermal shock
<i>hsp90</i>	GGTATCTAACCGTCTGGTGACA <sup>a</sup> TGTCTGCCTCAGCCTTATCC <sup>b</sup>	Response to thermal shock
<i>p53</i>	CCCTCAAAGCAGTCCCCA <sup>a</sup> TGTAGCGATCCACCTGATT <sup>b</sup>	Cell cycle arrest/apoptosis
<i>gst</i>	AGGCTACCGAAATGGCTG <sup>a</sup> CTCTGACTTGTAATAGGCCGC <sup>b</sup>	Biotransformation
<i>cyp1A</i>	AGGCATAGGGCTACA <sup>a</sup> CTGGTTTCGCGGGTTTCAT <sup>b</sup>	Biotransformation
<i>bax</i>	CCCTCAGGTGTGACCCG <sup>a</sup> TGCAACGTAAAGCTCTGCC <sup>b</sup>	Apoptosis
<i>casp3</i>	ATGATGCGACTCAATCACCC <sup>a</sup> ACTGGCTTATGTGCTTGTGTTCC <sup>b</sup>	Apoptosis
<i>casp6</i>	CTCCCCTTACGAGGAACA <sup>a</sup> ACTTCGCTAGATCGTCTCTATCAA <sup>b</sup>	Apoptosis
<i>casp9</i>	CGCTCCATACTGAGGCCG <sup>a</sup> GCTTTCTGGCCTCGCT <sup>b</sup>	Apoptosis
<i>acoA</i>	GGGCACCGTTAATGCCTAC <sup>a</sup> TGACTCGGGGTCATGTGTT <sup>b</sup>	Lipid metabolism
<i>Tgl</i>	ACACCCACCGTGCTTT <sup>a</sup> GTTTGTCTTGAGATCCTTGATTATCAG <sup>b</sup>	Lipid metabolism

<sup>a</sup> : Forward primer, <sup>b</sup>: Reverse primer

## 2.4 Metal and pesticide solutions

Reference toxicants ( $\text{CuSO}_4$  and S-metolachlor) and formalin were purchased from Sigma–Aldrich Chemical (St. Quentin Fallavier, France). The range of experimental concentrations was chosen on the basis of preliminary studies (Gamain et al., 2016). The metal and pesticides solutions were made up from analytical grade copper sulfate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) and S-metolachlor. Working solutions were obtained diluting the stock solutions ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$  for copper and  $250 \text{ mg.L}^{-1}$  for S-metolachlor) in FSW and were chemically analyzed. Two exposure concentrations were selected:  $2 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  of copper or  $100 \text{ ng.L}^{-1}$  of S-metolachlor.

The working solutions were chemically analyzed for pollutant concentrations confirmation. For chemical analysis of Cu, each seawater sample was acidified with 5% final of nitric acid (Nitric acid 65%, Fluka). Samples were then analyzed by Inductively-Coupled Plasma Optic Emission Spectrometry (ICP-OES, Vista Pro, Agilent Technologies) and by Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS, Xseries2, Thermofisher Scientific). The standards solutions were prepared from a multielementary calibration solution (Astasol-Mix M010, Analytika, Czech Republic), in a seawater certified solution (NASS-6 from NRCC-CNRC, Ottawa, Canada). The samples were diluted in a 3% final nitric acid solution (made from a nitric acid 65% FisherScientific Trace Metal Grade solution) 1:2 (v/v) for ICP-OES analysis and 1:3 (v/v) for ICP-MS analysis. Quantification limit were  $10 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  (ICP-OES) and  $0.3 \mu\text{g.L}^{-1}$  (ICP-MS).

Metolachlor levels were determined by liquid chromatography coupled with a triple quadrupole mass spectrometer and performed using a HPLC/MS/MS system from Agilent Technologies (HPLC 1290 system coupled to 6460 mass spectrometer) (mobile phase: water (5 mM ammonium acetate + 0.1% acetic acid)/methanol (100%/0% to 0%/100% within 17 min at 0.5 mL/ min); column: Kinetex C18 100 mm (length), 2.1 mm (internal diameter), 1.7 mm (porosity) ; ionization mode: ESI +). One mL of each individual solution was mixed with 50  $\mu\text{L}$  of mixture of internal standards (metolachlor d6) in methanol (nominal concentrations of  $100 \text{ ng.L}^{-1}$ ) and were directly analyzed. Procedural blanks (three blanks between each sample) were performed to ensure the absence of laboratory-contamination. This also ensured optimal cleaning of the chromatographic system between samples, as well as making it possible to achieve the lowest possible detection limits while avoiding cross-contamination. Metolachlor was quantified using a quantification transition. Its presence was attested through a transition confirmation but also based on the relationship between abundance and the quantification of transition. Recovery and reproducibility were determined using spiked water samples (at nominal concentration of  $100 \text{ ng.L}^{-1}$ ) processed at the same time as the samples to be characterized. Detection and quantification limits were of 0.4 and  $1.2 \text{ ng.L}^{-1}$  respectively.



### 2.5 Spermotoxicity and oocyte toxicity tests

A freshly collected sperm solution was added in the vials containing 10 mL of different conditions: control condition (FSW), solution of Cu at  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  or a solution of S-metolachlor  $100 \text{ ng.L}^{-1}$ . An oocyte aliquot (300 oocytes) was added in 2mL wells containing the different studied conditions. Four replicates for each condition were done. Sperm and oocytes were exposed during 30 min in the dark at  $24^{\circ}\text{C}$ . Three fertilization assays were then conducted (Table 2). For each assay, around 10 sperms for 1 oocyte were added into the wells containing oocyte.

Fertilization success was checked every 15min after the mix of sperm cells and oocytes, until the oocytes underwent their first cleavage within 120 min (His et al., 1999). Embryos were incubated at  $24^{\circ}\text{C}$  for 2 hours in the dark. When the 2-4 cells stage was achieved in the control treatment,  $25 \mu\text{l}$  of 1% buffered formalin were added to all treatment to stop fertilization and preserve the developing embryos. Fertilized oocytes were scored under an inverted microscope (Nikon eclipse TS100/TS100-F; TS100 LED MV/ TS100 LED-F MV) among 100 oocytes.

Table 2: Experimental design for gamete toxicity on Pacific oyster

	Unexposed sperm cells	Cu exposed sperm cells	Met exposed sperm cells
Unexposed oocytes	Assay A	/	/
Cu exposed oocytes	/	Assay B	/
Met exposed oocytes	/	/	Assay C

### 2.6 Histological study of the gonad

To identify and determine the state of gonadal maturation, an histological study was conducted on broodstock collected at different dates and study sites in 2014. For this, five cultivated and wild oysters were dissected to isolate the gonad. After being dissected, gonadal tissue samples (+ digestive gland) were placed in Bouin-Hollande's (75% picric acid, 20% formalin, 5% acetic acid, water) fixative for several hours, after which they were preserved in 70 % alcohol. Samples were then dehydrated through a graded series of alcohol, embedded in paraffin, sectioned at  $7 \mu\text{m}$  on a rotary microtome (Leica RM 2145), stained with Giemsa colorant and finally mounted on microscope slides. Sections were made from the gonadal area between the proximal end of the gut loop and the base of the foot. The sections were examined with a light microscope, first under low power (5x) to scan the entire gonadal area. The Leica Application software allows image acquisition and processing. Two fields of study are analyzed for each sample. On each field are measured gonadal area and tissue area. These data are used to calculate the percentage of occupancy of the gonad using the formula:

$$\frac{\text{gonadal area}}{\text{tissue} + \text{gonadal area}} \times 100$$

Averages of these percentages are then calculated for oysters of the same sex, from the same site, and living in the same conditions (wild or cultivated).

## 2.7 Statistical analysis

All data were expressed as means  $\pm$  standard error (S.E.). To analyze the data, they were first treated using the transformation:  $p' = \arcsin \sqrt{p}$ . P correspond to the raw data (percentage of abnormalities) specified in p values from 0 to 1 (Legendre and Legendre, 1998). Homogeneity of variance (Levene's test) was verified and then statistical analysis was performed by the Kruskal-Wallis tests. Differences among tested concentration means were then performed using kruskal post hoc test. Significance was accepted when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1 Chemical analysis of tested pollutant solutions

#### 3.1.1 Copper

In control condition (table 4), Cu concentration increased gradually over time. Concentrations are kept relatively constant between T0h and T24h. At the beginning of the experience with  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  of Cu, desired concentrations were achieved on the first date. For the other dates, 1.5 to 3 times more higher concentrations were obtained. After 24h-exposure, slight concentrations decreases were observed.

Table 4: Nominal and measured copper concentrations (mean values in  $\mu\text{g.L}^{-1} \pm \text{SD}$ ) at the beginning of genetic tests for each study condition and after 24h exposure at 24 °C. ND= not determined.

	Nominal concentration Measured concentration	Control condition		Cu $2\mu\text{g.L}^{-1}$	
		T0h	T24h	T0h	T24h
23-Jun-14	Comprian Cultivated	1	ND	2	1.5
	Comprian Wild	1	ND	2.7	1.9
	Les Jacquets Wild	1	ND	2	4.1
08-Jul-14	Comprian Cultivated	0.6	ND	2.6	2.3
	Comprian Wild	0.6	ND	4.3	5.7
	Les Jacquets Wild	0.6	1.5	3.1	2.6
	Les Jacquets Cultivated	0.6	1.4	3.2	2.6
15-Jul-14	Comprian Cultivated	2.2	ND	6.5	ND
	Comprian Wild	2.2	ND	5.6	ND
	Les Jacquets Wild	2.2	2.3	3.4	3.4
	Les Jacquets Cultivated	2.2	1.8	4.3	5.1
29-Jul-14	Comprian Cultivated	2.1	ND	3.6	ND
	Comprian Wild	2.1	1.9	5.9	3.5
	Les Jacquets Wild	2.1	1.5	4.6	2.3
	Les Jacquets Cultivated	2.1	2.2	4.4	3.7
11-Aug-14	Comprian Cultivated	3.1	3.4	4.5	3.9
	Comprian Wild	3.1	3.5	5	3.7
	Les Jacquets Wild	3.1	2.7	4.2	4.3
	Les Jacquets Cultivated	3.1	3	4.2	3.7

### 3.1.1 S-Metolachlor

In control condition, S-metolachlor concentrations were very low ranging from 3.5 to 6.2  $\text{ng.L}^{-1}$ . At the beginning of the exposure-experiment measured concentrations were close to the desired 100  $\text{ng.L}^{-1}$  of S-metolachlor (from 69.9 to 107.8  $\text{ng.L}^{-1}$ ). After 24h an important decrease of the concentrations was observed (table 5).

Table 5: Nominal and measured metolachlor concentrations (mean values in  $\text{ng.L}^{-1} \pm \text{SD}$ ) at the beginning of genetic tests for each study condition and after 24h exposure at 24 °C. ND= not determined.

	Nominal concentration	Control	Met 100 $\text{ng.L}^{-1}$	
		condition	T0h	T24h
	Measured concentration	T0h	T0h	T24h
23-Jun-14	Comprian Cultivated	5.8	96.2	4
	Comprian Wild	5.8	95.8	28.3
	Les Jacquets Wild	5.8	102.9	20.5
08-Jul-14	Comprian Cultivated	3.9	87.7	25.9
	Comprian Wild	3.9	83.4	20.5
	Les Jacquets Wild	3.9	104.9	57.3
	Les Jacquets Cultivated	3.9	95.9	53
15-Jul-14	Comprian Cultivated	6.2	87.8	ND
	Comprian Wild	6.2	107.8	ND
	Les Jacquets Wild	6.2	88.3	25.6
	Les Jacquets Cultivated	6.2	87.6	5.4
29-Jul-14	Comprian Cultivated	3.5	76.8	ND
	Comprian Wild	3.5	76.6	1.3
	Les Jacquets Wild	3.5	78.6	0.9
	Les Jacquets Cultivated	3.5	88.5	2.3
11-Aug-14	Comprian Cultivated	3.5	78.2	30.9
	Comprian Wild	3.5	83.7	45.6
	Les Jacquets Wild	3.5	76	1.7
	Les Jacquets Cultivated	3.5	69.9	1.3

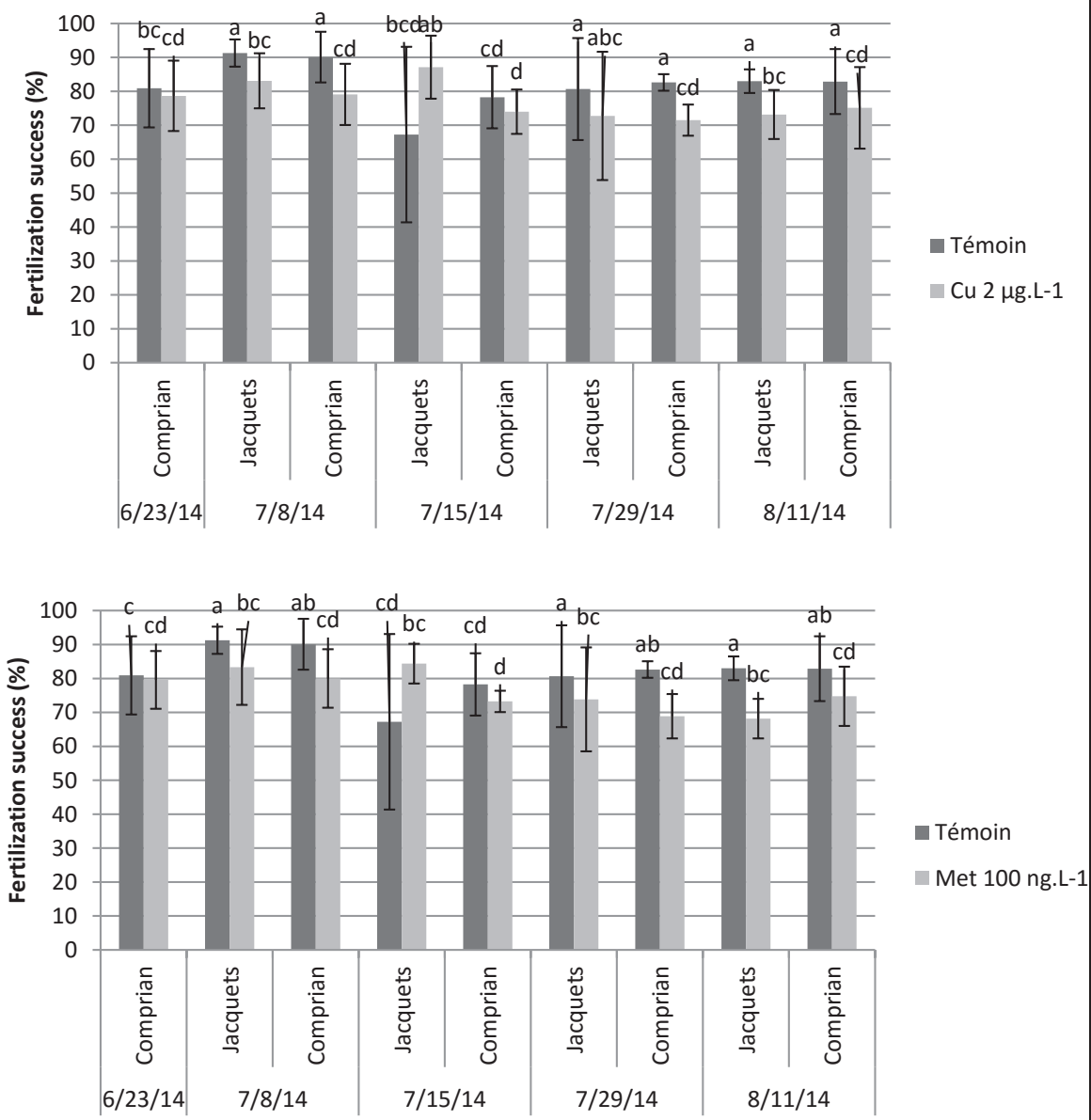
### 3.2 Spermotoxicity and oocyte toxicity

In control conditions, random variability appears depending on the site or study dates (Fig. 2). There is no significant difference of the fertilization success of cultivated oysters over time except at the two last date where significant decrease of the percentage of fertilization success occurs in the presence of Cu or S-metolachlore.

For the first two dates, there is no significant difference in fertilization success of gametes from wild oysters. On the contrary, on July 15, a significant decrease was observed at Les Jacquets, whatever the study conditions and from July 29 to Comprian.

A

Cultivated oysters



Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l’impact de la pollution du Bassin d’Arcachon sur le développement embryonnaire de l’huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

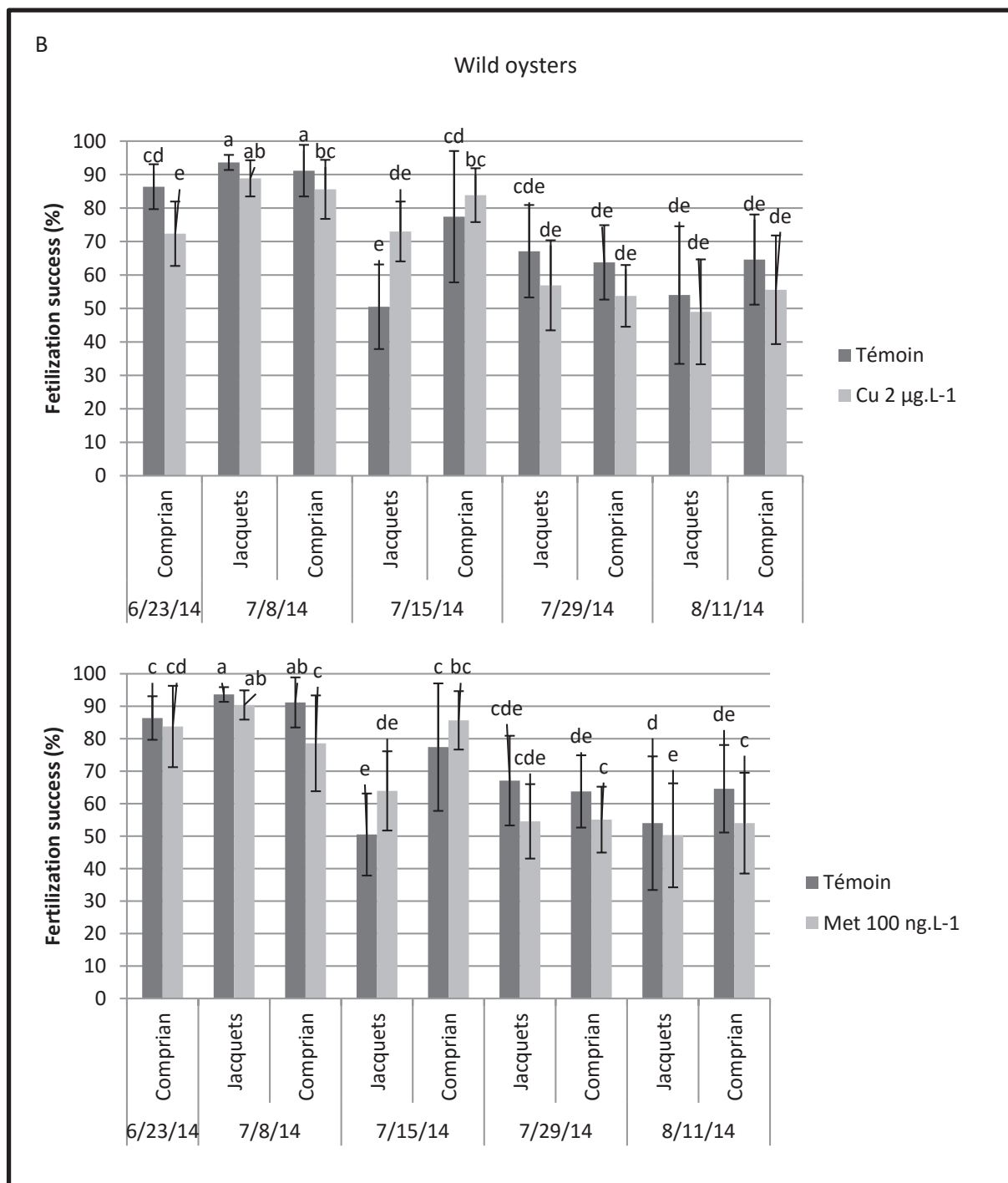
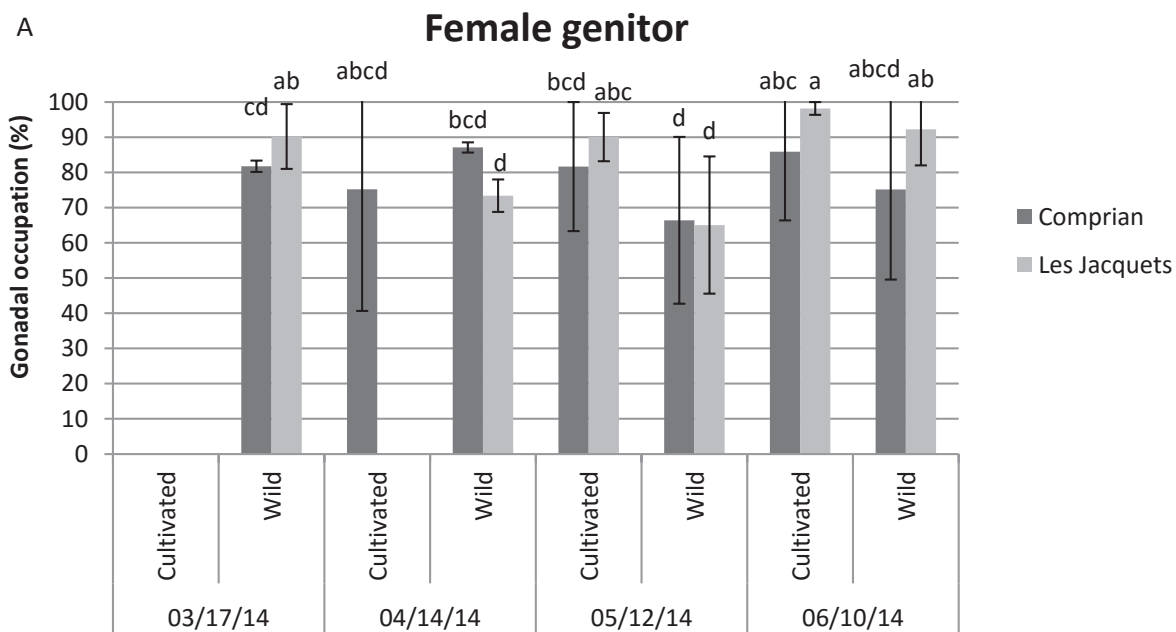


Figure 2 : Percentage of fertilization success resulting in spermotoxicity and oocyte toxicity of three different couples (Mean ± SD) of cultivated (A) or wild oysters(B)

**3.3 Histological study of the gonad**

In 2014, in female individuals, no significant difference in the percentage of gonadal occupation was observed for the two sampling sites, no more than between cultivated and wild oysters, excepted for wild individuals taken to Jacquets in May the 12<sup>th</sup> 2014. On all sampling dates, the average percentage of gonadal occupancy is between 65 and 100%.

For males, there was no significant difference in percentage of gonadal occupation whatever the location, dates and study conditions except for wild individuals collected on 05/12/14 (Fig. 3). Indeed, a smaller percentage of gonadal occupation was observed for wild oysters from comprian (22.5 % ± 11.6) and cultivated oysters from Les Jacquets (36.7 % ± 28.3). Overall, the percentage of occupation of the gonad males varies from 60-100% during the four-month studied with a majority of average between 70 and 90 % of gonadal occupation.



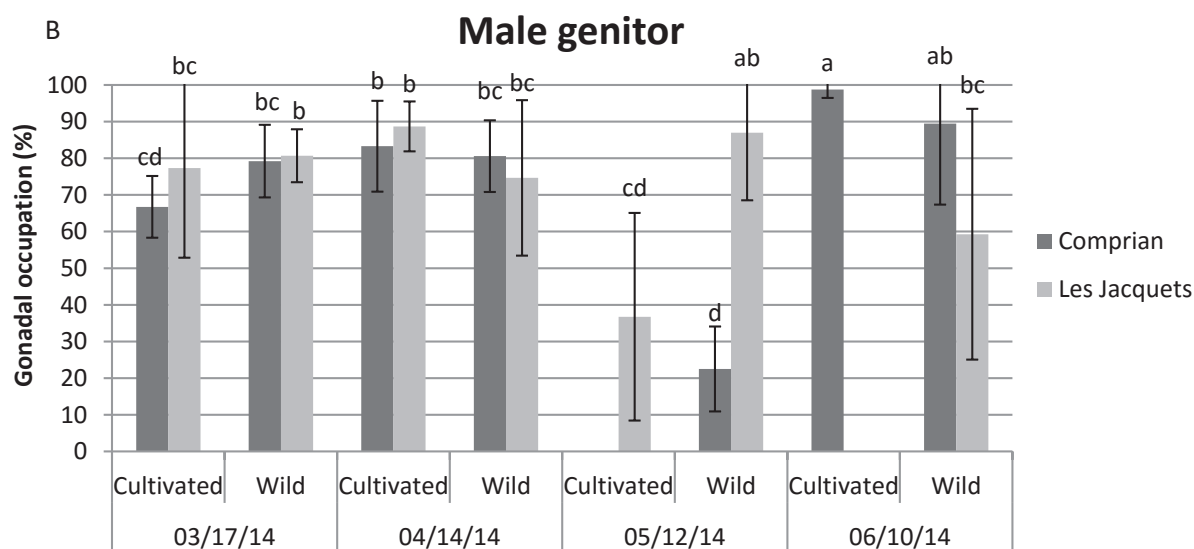


Figure 3: Percentage of gonadal occupation (%) behind oyster breeding period for cultivated and wild oysters from Le Tès or Comprian in 2014, for female (A) or male (B) genitors.

### 3.4 Gene expression

Real time PCR analysis of  $\beta$ -actin, Rpl7, EF1 $\alpha$  exhibited stable expression levels over time and treatment confirming their use as reference genes. Consequently, results of the different genes were normalized using the mean Ct value of these three reference genes. Induction or repression factors for each gene in the exposed-conditions were determined compared to control values. For all studied condition (control, Cu exposure or S-metolachlor exposure), *hsp70*, *hsp90*, *cyp1A*, *p53* gene expression levels were not reported because of their lack of significant difference. Tables 6 to 9 addressed the comparison of the expression levels obtained at Comprian vs Les Jacquets according to the life style (wild or cultivated) and their contamination exposure (Cu or S-metolachlor).

For Cu exposure (Table 6), D-larvae obtained from wild and cultivated oysters harvested at Comprian exhibited nearly the same response overtime. Indeed, no significant differences were obtained for the major times when the expression levels of each genes were compared, excepted for the first and the last sampling dates. Indeed, in June cultivated D-larvae possessed lower expression levels for near all the studied gene. On the contrary, in august *sod*, *casp9*, *bax* and *acc* appeared overexpressed in cultivated D-larvae compared to wild D-larvae. Comparison between cultivated and wild D-larvae from Les Jacquets showed that most of the time cultivated D-larvae have higher expression levels for genes involved in oxidative stress response, detoxification, apoptosis and mitochondrial metabolism (Table 6).



Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

If we compared now the two sites themselves, it was observed that wild D-larvae from Comprian have higher expression levels for most of the studied gene whatever the sampling date (Table 7). This statement was more important during the two first sampling date. This difference was not so important when cultivated D-larvae from the two sites were compared. However, sometimes expression levels of *sodmt*, *gpx*, *mt1*, *mt2*, *casp6*, *tgl*, *cox1* and *12S* appeared more expressed in D-larvae from Comprian than from those of Les Jacquets.

Nearly the same differences could be evidenced concerning responses to S-metolachlor exposure. Indeed comparison between cultivated and wild D-larvae from Comprian showed nearly the same expression levels overtime, except for the first sampling date where *tgl*, *12S*, *cas3* were more expressed in cultivated D-larvae than in wild D-Larvae (Table 8). Comparison between cultivated and wild D-larvae from Les Jacquets showed that most of the time cultivated D-larvae have higher expression levels for genes involved in oxidative stress response, detoxification, apoptosis and mitochondrial metabolism (Table 8).

When the two sites were compared, it was observed that wild D-larvae from comprian have higher expression levels for gene like *sod*, *cat*, *mt1*, *mt2* and *cas9*, whatever the sampling date (Table 9). This difference was not so important when cultivated D-larvae from the two sites were compared. Indeed, overtime only few genes were less expressed in cultivated D-larvae from comprian compared to Les Jacquets. However, in July the 15<sup>th</sup>, *mt1*, *mt2*, and *tgl*, appeared more expressed in D-larvae from Comprian.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

Table 6: Gene transcription levels in *C.gigas* at T24h (larvae) in copper exposure ( $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). **Comparison between cultivated vs wild D-larvae gene expression of Comprian or Les Jacquets** was shown. Data was expressed as induction (above 2) or repression (below 0.5) factors regarding to the control exposition (N=5, Anova,  $p<0.05$ ). Slashes refer to no change in gene expression. In red: induction factor, in green: repression factor

		Cultivated vs wild									
		Comprian					Les Jacquets				
Functions	Gene	06/23/14	08/07/2014	07/15/14	07/29/14	11/08/2014	06/23/14	08/07/2014	07/15/14	07/29/14	11/08/2014
Oxidative stress	<i>Sod</i>	0,20	/	/	ND	2,30	ND	2,29	/	0,43	/
	<i>Sodmt</i>	0,10	/	/	ND	/	ND	2,08	/	0,43	2,55
	<i>Gpx</i>	0,31	/	/	ND	/	ND	/	/	0,07	2,34
	<i>Cat</i>	0,00	/	/	ND	/	ND	2,36	/	/	/
Detoxification	<i>Mt1</i>	/	/	/	ND	/	ND	19,37	3,52	/	/
	<i>Mt2</i>	/	/	/	ND	/	ND	11,37	3,72	3,42	/
Apoptosis	<i>Casp3</i>	/	/	/	ND	/	ND	/	/	/	3,46
	<i>Casp6</i>	0,24	/	/	ND	/	ND	/	2,72	0,32	2,24
Biotransformation	<i>Casp9</i>	0,23	/	/	ND	2,64	ND	3,99	/	2,26	/
Cell cycle arrest/apoptosis	<i>Bax</i>	/	/	/	ND	2,26	ND	/	/	0,18	2,08
Lipid metabolism	<i>Acc</i>	0,45	/	0,48	ND	2,62	ND	2,36	/	/	/
Mitochondrial metabolism	<i>Tgl</i>	0,36	/	2,50	ND	0,17	ND	/	0,21	0,06	8,16
	<i>Coxl</i>	0,47	/	/	ND	/	ND	/	/	0,05	2,39
	12S	0,25	/	/	ND	/	ND	/	/	0,05	2,66

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

Table 7: Gene transcription levels in *C.gigas* at T24h (larvae) in copper exposure (2 µg.L-1). **Comparison between D-larvae gene expression of Comprian vs Les Jacquets was shown for cultivated or wild oysters.** Data was expressed as induction (above 2) or repression (below 0.5) factors regarding to the control exposition (N=5, Anova, p<0.05). Slashes refer to no change in gene expression. In red: induction factor, in green: repression factor

		Comprian vs Les Jacquets									
		Cultivated					Wild				
Functions	Gene	06/23/14	08/07/2014	07/15/14	07/29/14	11/08/2014	06/23/14	08/07/2014	07/15/14	07/29/14	11/08/2014
	<i>Sod</i>	ND	/	/	/	/	<b>5.23</b>	<b>3.08</b>	/	/	/
Oxidative stress	<i>Sodmt</i>	ND	<b>3.12</b>	/	/	/	<b>4.68</b>	<b>4.46</b>	/	<b>0.28</b>	<b>2.39</b>
	<i>Gpx</i>	ND	<b>5.74</b>	/	/	/	/	<b>2.35</b>	/	<b>0.02</b>	<b>2.51</b>
	<i>Cat</i>	ND	/	/	/	/	<b>38.91</b>	<b>4.07</b>	/	/	/
Detoxification	<i>Mt1</i>	ND	<b>0.25</b>	<b>2.15</b>	/	/	/	<b>2.72</b>	<b>11.59</b>	<b>5.05</b>	/
	<i>Mt2</i>	ND	<b>0.24</b>	<b>1.99</b>	/	/	<b>1.95</b>	<b>2.27</b>	<b>13.29</b>	<b>5.78</b>	/
Apoptosis	<i>Casp3</i>	ND	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	<i>Casp6</i>	ND	<b>3.40</b>	/	/	<b>0.37</b>	/	<b>3.45</b>	<b>2.76</b>	<b>0.08</b>	/
Biotransformation	<i>Casp9</i>	ND	/	/	/	/	<b>6.49</b>	<b>5.83</b>	/	/	<b>0.14</b>
Cell cycle arrest/apoptosis	<i>Bax</i>	ND	/	/	/	<b>2.21</b>	/	/	/	<b>0.16</b>	<b>2.03</b>
Lipid metabolism	<i>Acc</i>	ND	/	<b>0.47</b>	/	<b>3.06</b>	<b>3.40</b>	<b>3.56</b>	/	<b>3.92</b>	/
Mitochondrial metabolism	<i>Tgl</i>	ND	<b>2.69</b>	<b>2.76</b>	/	<b>0.03</b>	/	/	<b>0.23</b>	<b>0.03</b>	/
	<i>Cox1</i>	ND	<b>2.48</b>	/	/	<b>0.4</b>	<b>5.63</b>	/	/	<b>0.03</b>	/
	<i>12S</i>	ND	<b>3.48</b>	/	/	<b>0.25</b>	/	<b>2.89</b>	<b>2.29</b>	<b>0.02</b>	/

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

Table 8: Gene transcription levels in *C.gigas* at T24h (larvae) in metolachlor exposure (100 ng.L-1). **Comparison between cultivated vs wild D-larvae gene expression of Comprian or Les Jacquets** was shown. Data was expressed as induction (above 2) or repression (below 0.5) factors regarding to the control exposition (N=5, Anova,  $p < 0.05$ ). Slashes refer to no change in gene expression. In red: induction factor, in green: repression factor

		Cultivated vs wild									
		Comprian					Les Jacquets				
Functions	Gene	06/23/14	08/07/2014	07/15/14	07/29/14	11/08/2014	06/23/14	08/07/2014	07/15/14	07/29/14	11/08/2014
Oxydative stress	<i>Sod</i>	0.48	0.50	/	ND	/	ND	/	/	0.93	/
	<i>Sodmt</i>	/	/	/	ND	/	ND	/	/	/	2.49
	<i>Gpx</i>	/	/	/	ND	/	ND	/	/	0.28	2.80
Detoxification	<i>Cat</i>	0.22	/	0.27	ND	/	ND	/	13.2	/	/
	<i>Mt1</i>	/	/	/	ND	/	ND	/	7.47	/	/
	<i>Mt2</i>	/	0.50	/	ND	/	ND	/	10.51	/	/
Apoptosis	<i>Casp3</i>	4.34	/	/	ND	/	ND	/	2.53	/	3.12
	<i>Casp6</i>	/	0.23	/	ND	/	ND	/	/	2.57	/
Biotransformation	<i>Casp9</i>	/	0.48	/	ND	0.36	ND	2.80	/	2.02	/
Cell cycle arrest/apoptosis	<i>Bax</i>	/	/	/	ND	/	ND	/	/	/	2.27
Lipid metabolism	<i>Acc</i>	/	/	/	ND	/	ND	/	/	1.58	/
Mitochondrial metabolism	<i>Tgl</i>	72.69	/	/	ND	/	ND	/	0.1	23.90	/
	<i>Coxl</i>	/	/	/	ND	/	ND	/	/	0.32	2.69
	<i>12S</i>	5.45	/	0.45	ND	/	ND	2.97	/	0.80	3.4

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachon sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

Table 9: Gene transcription levels in *C.gigas* at T24h (larvae) in metolachlor exposure (100 ng.L-1). **Comparison between D-larvae gene expression of Comprian vs Les Jacquets** was shown for cultivated or wild oysters. Data was expressed as induction (above 2) or repression (below 0.5) factors regarding to the control exposition (N=5, Anova,  $p < 0.05$ ). Slashes refer to no change in gene expression. In red: induction factor, in green: repression factor

		Comprian vs Les Jacquets									
		Cultivated					Wild				
Functions	Gene	06/23/14	08/07/2014	07/15/14	07/29/14	11/08/2014	06/23/14	08/07/2014	07/15/14	07/29/14	11/08/2014
Oxydative stress	<i>Sod</i>	ND	0.36	/	ND	/	3.17	/	/	/	/
	<i>Sodmt</i>	ND	/	/	ND	/	/	/	/	/	2.34
	<i>Gpx</i>	ND	/	/	ND	/	/	/	/	/	2.36
	<i>Cat</i>	ND	/	0.13	ND	/	11.37	/	6.11	/	/
Detoxification	<i>Mt1</i>	ND	0.39	5.35	ND	0.47	3.02	0.48	31.62	/	/
	<i>Mt2</i>	ND	0.29	4.61	ND	/	3.92	/	37.06	/	/
Apoptosis	<i>Casp3</i>	ND	/	0.36	ND	/	/	/	/	/	/
	<i>Casp6</i>	ND	0.15	/	ND	/	0.28	/	/	/	3.98
Biotransformation	<i>Casp9</i>	ND	/	/	ND	/	/	3.52	/	1.93	/
Cell cycle arrest/apoptosis	<i>Bax</i>	ND	/	/	ND	/	/	/	/	0.61	2.01
Lipid metabolism	<i>Acc</i>	ND	/	/	ND	/	6.65	/	/	1.38	/
Mitochondrial metabolism	<i>Tgl</i>	ND	/		ND	0.11	0.02	/	0.18	15.85	0.10
	<i>CoxI</i>	ND	/	/	ND	/	4.97	/	/	0.5	/
	<i>12S</i>	ND	0.47	0.41	ND	/	0.45	4.33	/	0.79	/

## 2. Discussion

In our study, the toxicity of two different pollutants: Cu and S-metolachlor was evaluated on embryos and D-larvae of Japanese oyster *C. gigas*. Cu concentration appears stable over time. In contrast, S-metolachlor concentration decrease from 1.8 to 24 times less compare to the beginning of the experiment. These results are probably due to the experimental design. Containers of 3 liters were not closed and S-metolachlor was able to evaporate. In fact, S-metolachlor has been described as a volatile pesticide in soil (Rice et al., 2002). In this context, we can hypothesized that this compound could also be volatile in water due to exchange at the surface water because of the air stone.

In Arcachon bay, oysters have a breeding season from early June to mid-September (His, 1976). Thus at the end of the fall, and so once the breeding season is finished, the gonad has a reduced activity until spring, when different phases will succeed, to ensure a new breeding season. Around March, gametogenesis becomes active again and a carbohydrates accumulation starts. These carbohydrates will be subsequently transformed into lipid reserves of gametes. The maximum carbohydrate content is reached in May and it was about one month after that a lipid peak is observed (Maurer et al., 2011). Depending on environmental conditions, the maximum sexual maturity is reached between May and July and then begins spawning. Campaigns of 2014 were conducted from March to June. Individuals analyzed show no difference in gonadal occupation percentage whatever the location, dates and studied conditions (Figure 18). However lower percentages was observed, around 65% for the first sampling date, 70 % during the second date and 22.5 % or 36 % for wild oysters from Compiègne or cultivated oysters from Les Jacquets respectively on the third date. This therefore suggests that a change in the gonadal maturation took place between March and April. Histological examination is a primary criterion in the identification of the maturation state of the gonads. These can appear mature to almost 100 %  $\pm$  20 before the breeding season. This analysis thus verifies the percentage held by the gonad sexual products over the place occupied by the coat, but nothing indicates the state of maturity of the gametes themselves. Further study on the maturation of gametes could complement the first indications provided by histological sections. Publications have shown that greater magnification (x200) could be used to assess the stage of follicle. Only a morphological criterion can be advanced: distended follicle, small follicle, allowing still to complete the analysis and determine more easily if one approach provide an advanced state of maturation or not (Pouvreau et al., 2000). Even if histological analysis reveals no difference, maybe that gametes emitted in the environment are not quite mature leading to defects fecundation.

For many aquatic invertebrates as oysters, the fertilization is external, a sexually reproducing mode where male and female gametes are emitted into the environment in which the fertilization and

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

embryo development occurs (Song et al., 2009). Previous study on *Crassostrea gigas* from a commercial hatchery (Mai et al., 2014) has showed that exposure of both spermatozooids and oocytes to pesticides decreased the fertilization rate. In our study, a large variability in ability to reach the stage 2/4 cells was observed for wild oysters and cultivated oysters either in control conditions or during exposure to contaminants. Indeed, no significant difference was observed between the two study conditions regardless of the studied site. The main spawning took place on July the 20<sup>th</sup>, so it is possible that the gametes extract after that date gradually become senescent and thus have a lower capacity of fertilization explaining their inability to activate divisions or maybe the sperm-oocyte interactions was reduced. Moreover, it is important to take into account that all the gametes of the experiments on oysters from the Arcachon Bay were obtained by stripping and not by thermal stimulation. Thus, the remaining gametes in oysters that have already spawned by heat shock in the natural environment may not have been issued naturally due to a lack of maturation. For the two last studied dates, we observed a decrease on the capacity to obtain the stage 2/4 cells with wild oysters and cultivated oysters but this difference did not appears significant. So before the main spawning date, a high percentage of 2/4 cells have been encountered from 70 to 96 % but after the main spawning date, there is a decrease of this percentage for all studied conditions, all sites and all date. These study parameters were not considered in the analysis of the results of the embryo-larval test. Indeed, the counting of larval abnormalities was measured only on what was able to fertilize. It suggest that there is a percentage of embryos which cannot develop into D-larvae due to pollutant or maybe to the quality of the gamete, but the percentage of cells who can reach the state 2/4 cells can correctly develop into D-larvae. Environmental stress experienced by parents could make a significant difference in the response of their offspring. However, relevant studies on marine bivalves are very scarce especially for the field populations (Weng and Wang, 2014b). Molecular biomarkers can early detect environmental changes in water quality and thus effects, anticipating changes at higher levels of biological organization (Cajaraville et al., 2000; Viarengo et al., 2007). When environmental conditions change abruptly, cell must rapidly adjust its genetic expression to adapt itself to the stress or the new lifestyle conditions (Gasch et al., 2000). Our data show that the two pollutants do not disturb expression of genes encoding for protein involved in biotransformation (*cyp1A*), cell cycle arrest or apoptosis (*p53* or *bax*) or response to thermal shock (*hps70*, *hsp90*). In mammals, the protein p53 was shown to play a central role in the supervision of genome integrity. Indeed, p53 plays several major roles in cell cycle arrest, DNA repair, apoptosis and carcinogenesis (Farcy et al., 2008). Apoptosis is a fundamental function in the development of many organisms (Gervais et al., 2015). It is also a mechanism of host defense against environmental stress factors or pathogens by contributing to the elimination of infected cells (Guimaraes and Linden, 2004). So contamination level is not so much important to active

*p53* and *bax* genes and other mechanism set up. In response to xenobiotics exposure like metals or pesticides, various enzymes can be produced as cytochrome P4501A (Boutet et al., 2004b). This occurs in phase 1 of xenobiotic biotransformation process by xenobiotics oxidation. So, in D-larvae, this mechanism is not specifically induced in response to these concentrations of pollutants. *C.gigas* oysters encountered fluctuations of temperature during their life history. Data from this study confirm the optimal temperature for D-larvae development of 24 °C (AFNOR, 2009, Gamain et al., 2016c) because of the non-disturb *hsp 70* and *hsp 90* gene expression whatever the studied conditions.

Comparison of the lifestyle at the different site show that, in the presence of Cu or S-metolachlor, wild D-larvae from Comprian overexpress different gene in contrast to cultivated D-larvae. Wild oysters are present in their environment from generation to generation, accumulating as reefs and undergoing permanent changes of the environment in which they live. On the opposite, cultivated oysters, during one year, are transferred in other environment to facilitate growth. Moreover, in their environment, wild genitors are under contamination pressure through the water column, but also via the sediment. By filtering water column particulates, nutrients, sediment, and phytoplankton (Valety) oyster reefs are probably more subject to contamination. This supports the hypothesis of a background transmitted to offspring, in connection with the life history of the genitors. Damiens and collaborators demonstrate in 2006 that when adults oysters (*C.gigas*) have lived in a polluted area, their larvae may be less sensitive to pollution. On the contrary, in the presence of Cu or S-metolachlor, cultivated D-larvae from Les Jacquets under express genes. For S-metolachlor compound, it could be explain by the fact that S-metolachlor has never been identified in sediments of the Arcachon bay (Auby et al., 2007). Genes expression involved in oxidative stress (*cat*), detoxification (*mt1* and *mt2*) mitochondrial metabolism (*cox1* and *12 S*) is modified. Several organic contaminant, maybe present in the water, are known to increase catalase activity (Khessiba 2005). It could explain the high IF of *cat* gene (IF: 13.2). *mt1* and *mt2* gene have also an important induction factor (IF of 7.47 and 10.51 respectively).

Finally, comparison of the two study sites show that, whatever the lifestyle, D-larvae from Comprian have higher expression levels than Les Jacquets. In the presence of Cu, genes involved in detoxification (*mt1* and *mt2*), mitochondrial metabolism (*cox1* and *12 S*) oxidative stress (*Sodmt*, *gpx*) or lipid metabolism (*tg1*) are more express in cultivated D-larvae from Comprian in comparison to Les Jacquets. Previous study demonstrated that early embryo-larval stages of bivalve have been shown to be highly sensitive to metals (Beiras and His, 1995; Martin et al., 1981) and others shows no expression modulation for *mt1* and *mt2* genes on embryos of *C.gigas* from an hatchery whatever the concentrations of Cu tested (May and May, 1999). Nontoxic Cu levels do not induce MTs, although Cu is often bound to MTs *in vivo* (Cousins, 1985). However, embryotoxic effects were demonstrated by



increasing the percentage of larval abnormalities in the presence of the same Cu concentrations (Gamain et al., 2016b, 2016c). MTs could be induced by metal pollution in many taxa, including mammals, fish and aquatic invertebrates like oysters (Amiard et al., 2006). MTs are a superfamily of low molecular mass (6-7kDa) proteins, with a high ability to bind metallic ions (Ruttikay-Nedecky et al., 2013). They generally have four key functions: homeostatic regulation of essential metals, detoxification of toxic metals, protection against oxidative stress and neuroprotective mechanisms (Mao et al., 2012b). Furthermore, reactive oxygen species can be produced by certain external stimuli (Chen et al., 2007) and lead to overexpression of stress-related genes. Cells of oyster's larvae used defensive strategy to fight against oxidative stress such as mitochondrial superoxide dismutases (*sodmt*) and glutathion peroxidase (*gpx*). These genes represent an important adaptation to pollutant-induced stress (Richardson et al., 2008). Because of the need of energy, *tgl* gene is overexpressed on the first studied date and then under expressed. Fatty acids stored as triglycerides (TG) in the fat body serve as precursor in multiple processes including energy production. TG comprise the main energy reserve in all animals (Wolins et al., 2006). For wild D-larvae of Compiègne, several genes are overexpressed in comparison to Les Jacquets. As for cultivated D-larvae, genes involved in detoxification (*mt1* and *mt2*) mitochondrial metabolism (*cox1* and *12 S*) oxidative stress (*Sod*, *Sodmt*, *gpx*, *cat*) or lipid metabolism (*tgl*, *acc*) were induced, with sometimes an important IF: 38.91 for *cat* gene on the first date, or 11.59 and 13.29 for *mt1* and *mt2* genes respectively on the 07/15/14. Embryos of *Crassostrea virginica* are able to induce metallothioneins synthesis after exposure to heavy metal such as Cu or cadmium (Ringwood and Brouwer, 1995). Other genes involved in apoptosis (*caps6*, *casp9*) are overexpressed. These results demonstrate the large panel of genes induced at Compiègne compared to Les Jacquets and demonstrate the higher pressure of contamination suffered by genitors because of the capacity of the offspring to respond instead of being altered. A higher pressure contamination has already been observed at Compiègne. Arcachon Bay is end recipient of several rivers draining a watershed of 4138 km<sup>2</sup> (Auby et al., 2014), which is mainly dominated by agriculture and urban areas. It could explain why several genes are more expressed at Compiègne, since this site is much closer of the watershed arrivals than Les Jacquets.

## 5. Conclusion

The present study have revealed no impact of Cu and S-metolachlor on the capacity of gametes to begin fecundation. Gene expression analysis by q-PCR have showed D-larvae capacity to react to concentrations of copper or metolachlor encountered in the water of the Arcachon bay. Moreover, when adults have lived in a polluted area, their larvae may be less sensitive to pollution. Wild oysters appear to be more able to respond to the contamination than cultivated oysters.

### Acknowledgements

The authors thank the Aquitaine Region (OSQUAR Project), IRSTEA , Lienss , Intermunicipal Union of Arcachon Bay (SIBA) and Water Agency Adour Garonne (AEAG) for their financial support. We gratefully acknowledge the staff of the SEPANSO for their help in obtaining reference seawater. This work was part of the LABEX COTE cluster of excellence "Continental To coastal Ecosystems: evolution, adaptability and governance". The authors would like to thank James Emery for providing English proofreading services.

### Reference

- Aaseth, J., Norseth, T., 1986. Handbook on the toxicology of metals 2, in: New York, NY : Elsevier Science Publishers. pp. 233–254.
- Adams, S.M., 2005. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems, in: Marine Pollution Bulletin. pp. 649–657. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.11.040
- 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 biomarkers for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Mar. Environ. Res.* 28, 459–464.
- Adour-Garonne, A. de l’eau, 2013. Agence de l’eau Adour-Garonne - Journée technique « Qualité des eaux littorales : suivi et enjeux » Jeudi 20 juin 2013 – Espace culturel de Biganos (33) 1–5.
- Aerts, S., Haesbroeck, G., Ruwet, C., 2015. Multivariate coefficients of variation : Comparison and influence functions. *J. Multivar. Anal.* 142, 183–198. doi:10.1016/j.jmva.2015.08.006
- Agreste Primeur, 2014. Recensement de la conchyliculture 2012 160 000 tonnes de coquillages commercialisés 1–6.
- Akcha, F., Spagnol, C., Rouxel, J., 2012. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquat. Toxicol.* 106-107, 104–113. doi:10.1016/j.aquatox.2011.10.018
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160–202. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015
- Auby, I., 1991. Contribution à l’étude des herbiers de *Zostera noltii* dans le Bassin d' Arcachon : dynamique, production et dégradation, macrofaune associée. Volume 1 357.
- Auby, I., Bocquene, G., Quiniou, F., Dreno, J.P., 2007. Etat de la contamination du Bassin d’Arcachon par les insecticides et les herbicides sur la période 2005-2006. *Impact environnemental* 24, 108.
- Auby, I., Bost, C.-A., Budzinski, H., Dalloyau, S., Desternes, A., Belles, A., Trut, G., Plus, M., Pere, C., Couzi, L., Feigne, C., Steinmetz, J., 2011. Régression des herbiers de zostères dans le Bassin d’ Arcachon : état des lieux et recherche des causes Régression des herbiers de zostères dans le Bassin d’ Arcachon : état des lieux et recherche des causes. Ifremer ODE LER Arcachon 195.
- Auby, I., Maurer, D., 2004a. Etude de la reproduction de l’huître creuse dans le Bassin d'Arcachon. Ifremer.
- Auby, I., Maurer, D., 2004b. Etude de la reproduction de l’ huître creuse dans le Bassin d’ Arcachon Rapport final.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Auby, I., Maurer, D., 2014. Rôle des communautés phytoplanctoniques sur la reproduction de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) dans le bassin d'Arcachon 48 p.
- Auby, I., Maurer, D., Connès, C., Barbier, C., Perrière-Rumèbe, M., Rigouin, L., Tournaire, M.-P., 2012. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon Année 2012. IFREMER 1–63.
- Auby, I., Maurer, D., Passoni, S., Heroïn, D., Rigouin, L., Méteigner, C., Perrière-Rumèbe, M., Tournaire, M.-P., 2014. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon Année 2014. Ifremer 55.
- Auby, I., Oger-Jeanneret, H., Sauriau, P.-G., Hily, C., Barillé, L., 2010. Angiospermes des côtes françaises Manche-Atlantique. Propositions pour un indicateur DCE et premières estimations de la qualité. Annexe 2 : Fiches contenant les données sur les herbiers des différentes masses d'eau suivies dans le cadre de la DCE 152.
- Auffret, M., Oubella, R., 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. Comp. Biochem. Physiol. - A Physiol. 118, 705–712. doi:10.1016/S0300-9629(97)00017-0
- Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Le Floch, S., Renault, T., 2008. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Toxicol. Vitro. 22, 1610–1617. doi:10.1016/j.tiv.2008.04.011
- Baize, D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France), in: Institut National de La Recherche Agronomique INRA. p. 409.
- Barouki, R., 2006. Stress oxydant et vieillissement. Medecine/Sciences 22, 266–272. doi:10.1016/S0985-0562(02)00173-5
- Barros, P., Sobral, P., Range, P., Chicharo, L., Matias, D., 2013. Effects of sea-water acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas*. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 440, 200–206. doi:10.1016/j.jembe.2012.12.014
- Bebianno, M.J., Serafim, M. a., 1998. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. Sci. Total Environ. 214, 123–131. doi:10.1016/S0048-9697(98)00059-X
- Beiras, R., Albentosa, M., 2004. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals; implications for the implementation of seawater quality criteria. Aquaculture 230, 205–213. doi:10.1016/S0044-8486(03)00432-0
- Beiras, R., His, E., 1995. Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival and growth of *Mytilus galloprovincialis* mussel larvae. Mar. Ecol. Prog. Ser. 126, 185–189. doi:10.3354/meps126185
- Belin, C., Neaud-Masson, N., 2012. Cahier de Procédures REPHY 2012-2013 82.
- Ben Kheder, R., 2007. Étude sur le développement larvaire de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) en conditions contrôlées : recherche d'indices de qualité.
- Bernard, G., Bonhomme, P., Boudouresque, C.F., 2005. Recovery of the seagrass *Zostera marina* in a disturbed Mediterranean lagoon (Etang de Berre, Bouches-du-Rhône, Southern France). Hydrobiologia 539, 157–161. doi:10.1007/s10750-004-3080-7
- Bernard, I., 2011. Écologie de la reproduction de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les côtes atlantiques françaises : Vers une explication de la variabilité du captage.
- Bessi, H., ElAlami, M., 2009. Les bio-essais dans l'évaluation d'impact des polluants sur les écosystèmes dulçaquicoles. Les Technol. Lab. n°15 16–22.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Bijoux, H., 2014. Étude de l'impact des contaminants chimiques du Bassin d'Arcachon sur l'huître creuse *Crassostrea gigas* ; Approche in situ et expérimentale 387.
- Bird, A., 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396–398. doi:10.1038/nature05913
- Bisson, M., Houeix, N., Gay, G., Lacroix, G., Lefevre, J.P., Magaud, H., Tissot, S., Migne, V., Morin, A., 2005. Cuivre et ses dérivés. INERIS 1–66.
- Blanchet, H., 2004. Structure et Fonctionnement des peuplements benthiques du Bassin D'Arcachon 223.
- Bos, A.R., Bouma, T.J., de Kort, G.L.J., van Katwijk, M.M., 2007. Ecosystem engineering by annual intertidal seagrass beds: Sediment accretion and modification. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 74, 344–348. doi:10.1016/j.ecss.2007.04.006
- Bouchet, J.-M., Deltreil, J.-P., Manaud, F., Maurer, D., Triff, G., 1997. Etude intégrée du Bassin d'Arcachon. IFREMER Tome 5.
- Bouilly, K., Gagnaire, B., Bonnard, M., Thomasguyon, H., Renault, T., Miramand, P., Lapegue, S., 2006. Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 78, 149–156. doi:10.1016/j.aquatox.2006.02.028
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004a. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, 147–157. doi:10.1016/j.gene.2003.12.027
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004b. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *Gene, an Int. J. genes genomes* 272, 147–157. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04960.x
- Brenko, M.H., Calabrese, A., 1969. The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 4, 224–226.
- Brunel, S., Frasin, C., Kuperminc, M., Perras, M., Prevost, J., 2013. Agriculture littorale du Bassin d'Arcachon - Projet « Littoral, Interface terre-mer ». *AgroParisTech* 1–35.
- Buck, K.N., Ross, J.R.M., Russell Flegal, a., Bruland, K.W., 2007. A review of total dissolved copper and its chemical speciation in San Francisco Bay, California. *Environ. Res.* 105, 5–19. doi:10.1016/j.envres.2006.07.006
- Budzinski, H., Tapie, N., Magnan, A., Benyahia, M., 2011. Rapport REPAR 1–23.
- Buestel, D., Ropert, D., Prou, J., Gouletquer, P., 2009. History, status, and future of oyster culture in France. *J. Shellfish Res.* 28, 813–820.
- Buisson, S., Bouchart, V., Guerlet, E., Malas, J., Costil, K., 2008. Level of contamination and impact of pesticides in cupped oyster, *Crassostrea gigas*, reared in a shellfish production area in Normandy (France). *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 43, 655–664.
- Burnol, A., Duro, L., Grive, M., 2006. Éléments traces métalliques - Guide méthodologique - Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. INERIS 1–119. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Bustamante, P., Luna-Acosta, a., Clemens, S., Cassi, R., Thomas-Guyon, H., Warnau, M., 2012. Bioaccumulation and metabolisation of 14C-pyrene by the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed via seawater. *Chemosphere* 87, 938–944. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.049
- Cairns, J., HEATH, A.G., PARKER, B.C., 1975. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- to aquatic organisms. *Hydrobiologia* 47, 135–171.
- Cajaraville, M., Bebianno, M., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295–311.
- Calabrese, A., 1969. Individual and combined effects of salinity and temperature on embryos and larvae of the coot clam, *Mulinia lateralis* (Say). *Mar. Biol. Lab.* 137, 417–428.
- Calabrese, A., Collier, S., Nelson, D. a, Macinnes, J.R., 1973. The Toxicity of Heavy Metals to Embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 66, 162–166. doi:10.1007/BF00367984
- Calvet, R., 1989. Adsorption of organic chemicals in soils. *Environ. Health Perspect.* 83, 145–177. doi:10.1289/ehp.8983145
- Campbell, Reece, 2004. La biotechnologie-Chapitre 20, in: *Biologie*, 2e Edition. p. 1364.
- Carbonell, G., Tarazona, J., 1994. Toxicokinetics of copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 29, 213–221.
- Carriger, J.F., Rand, G.M., 2008. Aquatic risk assessment of pesticides in surface waters in and adjacent to the Everglades and Biscayne National Parks: I. Hazard assessment and problem formulation. *Ecotoxicology* 17, 660–679. doi:10.1007/s10646-008-0230-0
- Castaños, C., Pascual, M., Camacho, A.P., 2009. Reproductive biology of the nonnative oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), as a key factor for its successful spread along the rocky shores of northern Patagonia, Argentina. *J. Shellfish Res.* 28, 837–847.
- Chapman, P.M., Long, E.R., 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 14, 81–84. doi:10.1016/0025-326X(83)90305-3
- Chen, M., Yang, H., Delaporte, M., Zhao, S., 2007. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge. *Aquaculture* 271, 479–487. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.051
- Cheng, T., Combes, C., 1990. Influence of environmental factors on the invasion of molluscs by parasites: with special reference to Europe, in: Kluwer Academic Publishers. pp. 307–332.
- Choi, Y.K., Jo, P.G., Choi, C.Y., 2008. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 147, 286–92. doi:10.1016/j.cbpc.2007.11.002
- Claisse, D., Alzieu, C., 1993. Copper contamination as a result of antifouling paint regulations? *Mar. Pollut. Bull.* 26, 395–397. doi:10.1016/0025-326X(93)90188-P
- Clark, G.M., Goolsby, D.A., Battaglin, W.A., 1999. Seasonal and annual load of herbicides from the Mississippi River basin to the Gulf of Mexico. *Environ. Sci. Technol.* 33, 981–986. doi:10.1021/es980962u
- Cochennec-laureau, N., 2015. Rapport d'activités 2014 Laboratoire Environnement Ressources du Morbihan-Pays de Loire.
- Cochennec-Laureau, N., Baud, J.P., 2011. Bilan des surmortalités des huîtres creuses *Crassostrea gigas* depuis 2008. *Bull. épidémiologique* 42, 2–5.
- Cognie, B., Haure, J., Barillé, L., 2006. Spatial distribution in a temperate coastal ecosystem of the wild stock of the farmed oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 259, 249–259. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.05.037

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Connor, P.M., 1972. Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 3, 190–192.
- Cook, M.E., Moore, P. a., 2008. The effects of the herbicide metolachlor on agonistic behavior in the crayfish, *Orconectes rusticus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 94–102. doi:10.1007/s00244-007-9088-z
- Coquillé, N., Jan, G., Moreira, A., Morin, S., 2015. Use of diatom motility features as endpoints of metolachlor toxicity. *Aquat. Toxicol.* 158, 202–210. doi:10.1016/j.aquatox.2014.11.021
- Cotter, E., Malham, S.K., O'Keefe, S., Lynch, S. a., Latchford, J.W., King, J.W., Beaumont, A.R., Culloty, S.C., 2010a. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of growth, biochemistry and gametogenesis. *Aquaculture* 303, 8–21. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.02.030
- Cotter, E., Malham, S.K., O'Keefe, S., Lynch, S.A., Latchford, J.W., King, J.W., Beaumont, A.R., Culloty, S.C., 2010b. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of growth, biochemistry and gametogenesis. *Aquaculture* 303, 8–21. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.02.030
- Cousins, R., 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* 65, 238–309.
- Crespo, A., 2009. Présence et sources des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le Bassin d'Arcachon 458.
- Cunningham, F.X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K. a, DellaPenna, D., Gantt, E., 1996. Functional analysis of the B and E lycopene cyclase enzymes of arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 8, 1613–1626.
- Czernichowski-Lauriol, I., Caudron, M., 1999. Pollution des eaux souterraines et superficielles par des produits phytosanitaires dans un même bassin hydrogéologique - Application dans le bassin de la Serre, département de l'Aisne. Rap. BRGM R 40615 71.
- Dagens, N., 2012. Réseau Pesticides Bassin d'Arcachon (REPAR) - Rapport d'étude - Les pratiques phytosanitaires agricoles et non agricoles sur le Bassin d'Arcachon 73.
- Dameron, C., Howe, P., 1998. Copper environmental health criteria n°200, World Health Organization. Geneva.
- Damiens, G., His, E., Quiniou, F., Roméo, M., 2004. Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comp. Biochem. Physiol. - Part C Toxicol. Pharmacol.* 138, 121–128.
- Damiens, G., Mouneyrac, C., Quiniou, F., His, E., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., 2006. Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*. *Environ. Pollut.* 140, 492–499. doi:10.1016/j.envpol.2005.08.006
- Davarpanah, E., Guilhermino, L., 2015. Single and combined effects of microplastics and copper on the population growth of the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 167, 269–275. doi:10.1016/j.ecss.2015.07.023
- Depledge, M., 1994. The rationale basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. Non destructive biomarkers in vertebrates, in: FOSSI, M.C., LEONZIO, C., Eds. Lewis Publishers. pp. 271–296.
- Deslous-Paoli, J., 1981. Toxicité des éléments métalliques dissous pour les larves d'organismes marins : données bibliographiques. *Rev. des Trav. 'l Inst. des pêches Marit.* 45, 73–83.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachons sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Devi, M., Thomas, D., Barber, J., Fingerman, M., 1996. Accumulation and physiological and biochemical effects of Cadmium in a simple aquatic food chain. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 38–43.
- Devier, M.-H., 2003. Etude intégrée sur l'impact des différentes classes de contaminants (composés organostanniques, métaux, HAP, PCB) sur les moules. Bioaccumulation et réponses biochimiques.
- Di Poi, C., Evariste, L., Serpentine, A., Halm-Lemeille, M.P., Lebel, J.M., Costil, K., 2013. Toxicity of five antidepressant drugs on embryo-larval development and metamorphosis success in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 13302–13314. doi:10.1007/s11356-013-2211-y
- Doney, S.C., Ruckelshaus, M., Emmett Duffy, J., Barry, J.P., Chan, F., English, C. a, Galindo, H.M., Grebmeier, J.M., Hollowed, a B., Knowlton, N., Polovina, J., Rabalais, N.N., Sydeman, W.J., Talley, L.D., 2012. Climate change impacts on marine ecosystems. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 4, 11–37. doi:10.1146/annurev-marine-041911-111611
- Doroudi, M., Southgate, P., Mayer, R., 1999. The combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.). *Aquac. Res.* 30, 271–277.
- Dorsey, A., Ingerman, L., Swarts, S., Corporation, S.R., 2004. Toxicological profile for copper. Agency Toxic Subst. Dis. Regist. Div. Toxicol. Inf. Branch 314.
- Dos Santos, A.E., Nascimento, I.A., 1985. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* guilding, 1828. *Aquaculture* 47, 335–352.
- Dos santos, A.E., Nascimento, I.A., 1985. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* guilding , 1828 47, 335–352.
- Du, Y., Zhang, L., Xu, F., Huang, B., Zhang, G., Li, L., 2013. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) development by quantitative real-time PCR. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 939–945. doi:10.1016/j.fsi.2012.12.007
- Dubourg, B., 2012. Les huîtres triploïdes en plein débat. *Sud Ouest*.
- Echeverrigaray, Gomes, Tavares, 1999. Isolation and characterization of Ca<sup>2+</sup>-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 15, 679–681.
- Eisenreich, S.J., JRC, I.I., C. Bernasconi, P. Campostrini, A. De Roo, G. George, A.-S., Heiskanen, J. Hjorth, N. Hoepffner K.C. Jones, P. Noges, N., Pirrone, N. Runnalls, F. Somma, N. Stilanakis, G. Umlauf, W., van de Bund, P. Viaroli, J. Vogt, J.-M.Z., 2005. Climate Change and the European Water Dimension 1–253.
- Ettajani, H., Amiard, J.C., 1995. Biodisponibilité de quelques métaux fixés sur les matières en suspension (MES) en milieu estuarien. *Hydroécologie Appliquée* 7, 75–89. doi:10.1051/hydro:1995005
- FAO, 2010. LA SITUATION MONDIALE DES PÊCHES ET DE L'AQUACULTURE - 2010. Département des pêches l'aquaculture la FAO. Organ. des nations Unies pour l'alimentation l'agriculture Rome, 241 p.
- Farcy, E., Fleury, C., Lelong, C., Dubos, M.P., Voiseux, C., Fiévet, B., Lebel, J.M., 2008. Molecular cloning of a new member of the p53 family from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and seasonal pattern

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l’impact de la pollution du Bassin d’Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- of its transcriptional expression level. *Mar. Environ. Res.* 66, 300–308. doi:10.1016/j.marenvres.2008.04.006
- Farcy, É., Voiseux, C., Lebel, J.M., Fiévet, B., 2009. Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress Chaperones* 14, 371–380. doi:10.1007/s12192-008-0091-8
- Fauvelle, V., N, M., F, D., K, M., M, E., H., B., 2012. Use of mixed-mode ion exchange sorbent for the passive sampling of organic acids by polar organic chemical integrative sampler (POCIS). *Environ. Sci. Technol.* 46, 13344–53. doi:10.1021/es3035279
- Fitzpatrick, J.L., Nadella, S., Bucking, C., Balshine, S., Wood, C.M., 2008. The relative sensitivity of sperm, eggs and embryos to copper in the blue mussel (*Mytilus trossulus*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 147, 441–9. doi:10.1016/j.cbpc.2008.01.012
- Flemming, C.A., Trevors, J.T., 1989a. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water. Air. Soil Pollut.* doi:10.1007/BF00228784
- Flemming, C.A., Trevors, J.T., 1989b. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water. Air. Soil Pollut.* 44, 143–158.
- Fujiya, M., 1970. Oyster farming in Japan. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 20, 464–479. doi:10.1007/BF01609922
- Gacia, E., Duarte, C.M., 2001. Sediment Retention by a Mediterranean *Posidonia oceanica* Meadow: The Balance between Deposition and Resuspension. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 52, 505–514. doi:DOI: 10.1006/ecss.2000.0753
- Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 536–547.
- Galay-Burgos, M., Spurgeon, D.J., Weeks, J.M., Stürzenbaum, S.R., Morgan, a J., Kille, P., 2003. Developing a new method for soil pollution monitoring using molecular genetic biomarkers. *Biomarkers* 8, 229–39. doi:10.1080/354750031000138685
- Galtsoff, P., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fish. Bull.* 64, 480.
- Gamain, P., Agnès Feurtet-Mazel Régine Maury-Brachet Isabelle Auby, A.B.H.B., Daffe, G., Gonzalez, P., 2016a. Experimental ecotoxicological study of the impact of a cocktail of pesticides and copper on the seagrass *Zostera noltei* in the Arcachon bay. En préparation.
- Gamain, P., Cachot, J., Gonzalez, P., Gourves, P.Y., Budzinski, H., Morin, B., 2016b. Do temporal and spatial parameters or lifestyle of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* broodstock native from the Arcachon Bay (Southwest coast of France) affect pollutant bioaccumulation, offspring development and tolerance to pollutants? En préparation.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Clérendean, C., Budzinski, H., Mazella, N., Martin, C., Gourves, P.Y., Morin, B., 2016c. Influence of the combined effects of temperature and pollutants on embryon-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. En préparation.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Pardon, P., Tapie, N., Gourves, P.Y., Budzinski, H., Morin, B., 2016d. Combined effects of pollutants and salinity on embryon-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 113, 31–38. doi:10.1016/j.marenvres.2015.11.002
- Ganthy, F., 2011. Rôle des herbiers de zostères (*Zostera noltii*) sur la dynamique sédimentaire du Bassin d’Arcachon 284.



Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Gasch, P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O., 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 11, 4241–4257. doi:10.1091/mbc.11.12.4241
- Geffard, O., 2001. Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : évaluation chimique et biologique, biodisponibilités des contaminants sédimentaires.
- Geffard, O., Budzinski, H., His, E., 2002. The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. *Ecotoxicology* 11, 403–416. doi:10.1023/A:1021024415695
- Geffard, O., Budzinski, H., LeMenach, K., 2004. " petroleum: Bio-tests applied to petroleum water-accommodated fractions and natural contaminated samples. *Aquat. Living Resour.* 17, 289–296. doi:10.1051/alr
- Geracitano, L. a., Luquet, C., Monserrat, J.M., Bianchini, a., 2004. Histological and morphological alterations induced by copper exposure in *Laeonereis acuta* (*Polychaeta, Nereididae*). *Mar. Environ. Res.* 58, 263–267. doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.069
- Gerard, A., Boudry, P., Launav, S., Heurtebise, S., Phelipot, L.E.T.P., 1995. Contrôle de la Gamétogenèse des huîtres creuses et plates . Relations " Reproduction " Et " Génétique ."
- Gervais, O., Renault, T., Arzul, I., 2015. Induction of apoptosis by UV in the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 232–242. doi:10.1016/j.fsi.2015.05.046
- Gieskes, J.M., Han, S., Rathburn, A., Rothwell, G., Pérez, M.E., Porrachia, M., Barbanti, A., Deheyn, D.D., 2015. Anthropogenic contaminants in Venice Lagoon sediments and their pore fluids: Results from the SIOSED Project. *Mar. Chem.* 174, 73–84. doi:10.1016/j.marchem.2015.05.008
- Gilliom, R.J., 2007. Pesticides in U.S. streams and groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3408–3414. doi:10.1021/es072531u
- Goberville, E., Beaugrand, G., Sautour, B., Tréguer, P., 2010. Climate-driven changes in coastal marine systems of western Europe. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 408, 129–147. doi:10.3354/meps08564
- Gomiero, A., Viarengo, A., 2014. Effects of elevated temperature on the toxicity of copper and oxytetracycline in the marine model, *Euplotes crassus*: A climate change perspective. *Environ. Pollut.* 194, 262–271.
- Greenwood, P., 1981. Some effects of temperature-salinity combinations on the early development of the sea urchin *Parechinus angulosus* (Leske). *Fertilization. J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 51, 119–131.
- Groisman, P.Y., Karl, T.R., Easterling, D.R., Knight, R.W., Jamason, P.F., Hennessy, K.J., Suppiah, R., Page, C.M., Wibig, J., Fortuniak, K.V.N., Douglas, A., Førlund, E., Zhai, P.-M., 1999. Change in the probability of heavy precipitation : important indicators of climatic change. *Clim. Change* 42, 243–283.
- Guimaraes, A., Linden, R., 2004. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.* 271, 1638–1650. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04084.x
- Gunkel, G., Streit, B., 1980. Mechanisms of bioaccumulation of herbicide (atrazine, s-triazine) in a freshwater mollusc (*Ancylus fluviatilis mull.*) and a fish (*Coregonus fera jurine*). *Water Res.* 14, 1573–1584.
- Hadfield, M.G., 2000. Why and how marine-invertebrate larvae metamorphose so fast. *CELL Dev. Biol.* 11, 437–443. doi:10.1006/scdb.2000.0197

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Hamdoun, A.M., Cheney, D.P., Cherr, G.N., 2003a. Phenotypic Plasticity of HSP70 and HSP70 Gene Expression in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*): Implications for Thermal Limits and Induction of Thermal Tolerance. *Biol. Bull.* 205, 160–169.
- Hamdoun, A.M., Cheney, D.P., Cherr, G.N., Box, P.O., Bay, B., Ave, S., Toxicology, E., Davis, C., 2003b. Phenotypic Plasticity of HSP70 and HSP70 Gene Expression in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*): Implications for Thermal Limits and Induction of Thermal Tolerance 160 –169. doi:10.2307/1543236
- Hartmann, D.J., Klein Tank, A.M.G., Rusticucci, M., Alexander, L. V, Brönnimann, S., Charabi, Y.A.-R., Dentener, F.J., Dlugokencky, E.J., Easterling, D.R., Kaplan, A., Soden, B.J., Thorne, P.W., Wild, M., Zhai, P., 2013. Observations: Atmosphere and Surface. *Clim. Chang.* 2013 Phys. Sci. Basis. Contrib. Work. Gr. I to Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang. 159–254. doi:10.1017/CBO9781107415324.008
- Helm, M.M., Millican, P.F., 1977. Experiments in the hatchery rearing of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 11, 1–12.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals, *Rhinology. Supplement.* doi:10.1159/0003199858
- Heugens, E.H.W., Jager, T., Creyghton, R., Kraak, M.H.S., Hendriks, a. J., Van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2003. Temperature-dependent effects of cadmium on *daphnia magna*: Accumulation versus sensitivity. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2145–2151. doi:10.1021/es0264347
- His, E., 1976. La detection des pontes dans le milieu naturel : application de l'ostréographie a l'etude de la reproduction des huîtres. *Haliotis* 5, 10.
- His, E., 1991. Biologie et écotoxicologie des véligères de *Crassostrea gigas* (Thunberg) dans le Bassin d'Arcachon.
- His, E., Beiras, R., Quiniou, F., Parr, A.C.S., Smith, M.J., Cowling, M.J., Hodgkiss, T., 1996. The non-toxic effects of a novel antifouling material on oyster culture. *Water Res.* 30, 2822–2825.
- His, E., Beiras, R., Silhouette, C., 1997. A Simplification the Bivalve Embryogenesis and Larval Development Bioassay Method for Water Quality Assessment. *Water. Res* 31, 351–355. doi:10.1016/S0043-1354(96)00244-8
- His, E., Heyvang, I., Geffard, O., De Montaudouin, X., 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Res.* 33, 1706–1718. doi:10.1016/S0043-1354(98)00381-9
- His, E., Robert, R., 1982. Le danger des traitements par le sulfate de cuivre en zone conchylicole : toxicité vis-à-vis des oeufs et des jeunes larves de *Crassostrea gigas*. *Rev. des Trav. l'Institut des Pêches Marit.* 45, 117–125.
- His, E., Robert, R., Dinét, A., 1989a. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*.
- His, E., Robert, R., Dinét, A., 1989b. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 100, 455–463.
- His, E., Seaman, M., 1993. Effects of twelve pesticides on larvae of oysters (*Crassostrea gigas*) and on two species of unicellular marine algae (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*). *ICES Mar. Environ. Qual. Comm.* 8.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Hodson, P., Borgmann, U., Shear, H., 1979. Copper in the environment: Part 2 Health Effects, in: J. O. Nriagu, Ed., John Wiley & Sons Ltd, Toronto. pp. 307–372.
- Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P.J., Hooten, A.J., Steneck, R.S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C.D., Sale, P.F., Edwards, A.J., Caldeira, K., Knowlton, N., Eakin, C.M., Iglesias-Prieto, R., Muthiga, N., Bradbury, R.H., Dubi, A., Hatziolo, M.E., 2007. Coral reefs under rapid climate Change and Ocean Acidification. *Sci. mag* 318, 1737–1742.
- Hollows, C., Johnston, E., Marshall, D., 2007. Copper reduces fertilization success and exacerbates Allee effects in the field. *Mar. Pollut. Bull.* 333, 51–60.
- Holmstrup, M., Bindesbøl, A.-M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.-R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Ferreira, A.L.G., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P.E., Bayley, M., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Sci. Total Environ.* 408, 3746–3762. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.10.067
- Horiguchi, T., Imai, T., Cho, H.S., Shiraishi, H., Shibata, Y., Morita, M., Shimizu, M., 1998. Acute toxicity of organotin compounds to the larvae of the rock shell, *Thais clavigera*, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the giant abalone, *Haliotis madaka*. *Mar. Environ. Res.* 46, 469–473. doi:10.1016/S0141-1136(97)00058-5
- Hrs-Brenko, M., 1981. The growth and survival of larvae of several bivalve species at high temperatures and the practicability of their culture in heated effluent waters. *Acta Biol. Iugosl. Ichthyol.* 13, 29–37.
- Hrs-Brenko, M., Calabrese, A., 1969. The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 4, 224–226.
- Hrs-Brenko, M., Claus, C., Bubic, S., 1977. Synergistic effects of lead, salinity and temperature on embryonic development of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biol.* 44, 109–115. doi:10.1007/BF00386951
- Hung, T.-C., Meng, P.-J., Han, B.-C., Chuang, A., Huang, C.-C., 2001. Trace metals in different species of mollusca, water and sediments from Taiwan coastal area. *Chemosphere* 44, 833–841.
- Ifremer, 2008. Impact potentiel des activités nautiques sur la qualité des eaux du Bassin d' Arcachon. IFREMER 35.
- Ifremer, 2009. Fiche d' information Ifremer - Les huîtres triploïdes - Fiche Aquaculture du 27 novembre 2009.
- Ifremer, 2014. Qualité du Milieu Marin Littoral - Bulletin de la surveillance - Edition 2014 131.
- IPCC, 2013. Working group I contribution to the IPCC fifth assessment report climate change 2013 : The physical science basis final draft underlying scientific-technical assessment.
- Jones, C.G., Lawron, J.H., Shachak, M., 1997. Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology* 78, 1946–1957. doi:10.1890/0012-9658(1997)078[1946:PANEOO]2.0.CO;2
- Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M., 1994. Organisms as Ecosystem Engineers Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69, 373–386.
- Kinne, 1964. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. II. Salinity and temperature-salinity combinations. *Ocean. Mar. Biol. Annu. Rev.* 2, 281–339.
- Ko, G.W.K., Dineshram, R., Campanati, C., Vera, C.B.S., Havenhand, J., Thiyagarajan, V., 2014.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Interactive Effects of Ocean Acidification, Elevated Temperature and Reduced Salinity on Early-Life Stages of the Pacific Oyster. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10079–10088. doi:10.1021/es501611u
- Kroeker, K.J., Kordas, R.L., Crim, R., Hendriks, I.E., Ramajo, L., Singh, G.S., Duarte, C.M., Gattuso, J.P., 2013. Impacts of ocean acidification on marine organisms: Quantifying sensitivities and interaction with warming. *Glob. Chang. Biol.* 19, 1884–1896. doi:10.1111/gcb.12179
- Kroeker, K.J., Kordas, R.L., Crim, R.N., Singh, G.G., 2010. Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecol. Lett.* 13( 11), 1419–1434.
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R., 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* (80-. ). 319, 1827–1830. doi:10.1126/science.1153069
- Kumar, a., Correll, R., Grocke, S., Bajet, C., 2010. Toxicity of selected pesticides to freshwater shrimp, *Paratya australiensis* (Decapoda: Atyidae): Use of time series acute toxicity data to predict chronic lethality. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 360–369. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.09.001
- Kurihara, H., Kato, S., Ishimatsu, A., 2007. Effects of increased seawater pCO<sub>2</sub> on early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Biol.* 1, 91–98. doi:10.3354/ab00009
- Lahman, S.E., Trent, K.R., Moore, P. a., 2015. Sublethal copper toxicity impairs chemical orientation in the crayfish, *Orconectes rusticus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 369–377. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.12.022
- Lannig, G., Flores, J.F., Sokolova, I.M., 2006. Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: Pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquat. Toxicol.* 79, 278–287.
- Lauenstein, G.G., 1995. Comparison of organic contaminants found in mussels and oysters from a current mussel watch project with those from archived mollusc samples of the 1970s. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 826–833. doi:10.1016/0025-326X(95)00089-6
- Le Berre, I., Hily, C., Lejart, M., Gouill, R., 2009. Analyse spatiale de la prolifération de *C. gigas* en Bretagne. *Cybergeog Eur. J. Geogr. Environnement, Nature, Paysage.* doi:10.4000/cybergeog.22818
- Le Berre, S., Courtel, J., Brigand, L., 2010. Etude de la fréquentation nautique du Bassin d'Arcachon - Rapport final. Dir. régionale des Aff. Marit. Aquitaine – Serv. départemental Arcachon Géomer, Umr 6554 LETG – Univ. Bretagne Occident. 102.
- Legendre, Legendre, 1998. Numerical ecology. Transformation 1–4.
- Legoff, F., Bonnet, V., 2004. Devenir et comportement des métaux dans l' eau : biodisponibilité et modèles BLM Rapport technique Devenir et comportement des métaux dans l' eau : biodisponibilité et modèles BLM Rapport technique. INERIS 87.
- Lehotay, S.J., Harman-fetcho, J.A., Mcconnell, L.L., 1998. Agricultural Pesticide Residues in Oysters and Water from Two Chesapeake Bay Tributaries 37, 32–44.
- Lejart, M., 2009. Etude du processus invasif de *Crassostrea gigas* en Bretagne: Etat des lieux, dynamique et conséquences écologiques.
- Leverett, D., Thain, J., 2013. Oyster embryo-larval bioassay ( revised ), in: ICES TECHNIQUES IN MARINE ENVIRONMENTAL SCIENCES. p. 38.
- Lewbart, G.A., 2011. No Title, in: Invertebrate Medicine, 2nd Edition. p. 504.
- Liang Liang, Z., Hun Kim, Y., Feng Zhang, Z., Min Lim, S., Ho Kang, K., 2009. Water temperature and

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- salinity tolerance of embryos and spat of the mussel, *Musculista senhousia*. Korean J. Malacol. 25, 179–187.
- Lin, H., Hsu, S., Hwang, P.P., 2000. Maternal transfer of cadmium tolerance in larval *Oreochromis mossambicus*. J. Fish Biol. 57, 239–249.
- Lindquist, S., Craig, E.A., 1988. The heat-shock proteins.
- Littaye, A., Dantas, M., Hubert, R., 2011. Projet de parc naturel marin sur le Bassin d'Arcachon et son ouvert. Agence des Aires Mar. protégées 152.
- Liu, H., Xiong, M., 2009. Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metolachlor to *Chlorella pyrenoidosa*. Aquat. Toxicol. 93, 100–106. doi:10.1016/j.aquatox.2009.04.006
- Liu, H., Ye, W., Zhan, X., Liu, W., 2006. A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 63, 451–455. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.02.002
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. Methods 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lough, R., Gonor, J., 1971. Early embryonic stages of *Adula californiensis* (Pelecypoda : Mytilidae) and the effect of temperature and salinity on developmental rate. Mar. Biol. 8, 118–125.
- Loureiro, S., Newton, A., Icely, J., 2006. Boundary conditions for the European Water Framework Directive in the Ria Formosa lagoon, Portugal (physico-chemical and phytoplankton quality elements). Estuar. Coast. Shelf Sci. 67, 382–398. doi:10.1016/j.ecss.2005.11.029
- Lucas, C.H., Horton, A.A., 2014. Short-term effects of the heavy metals, Silver and copper, on polyps of the common jellyfish, *Aurelia aurita*. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 461, 154–161. doi:10.1016/j.jembe.2014.08.003
- Luna-acosta, A., Renault, T., Thomas-guyon, H., Faury, N., Saulnier, D., Budzinski, H., 2012. Chemosphere Detection of early effects of a single herbicide ( diuron ) and a mix of herbicides and pharmaceuticals ( diuron , isoproturon , ibuprofen ) on immunological parameters of Pacific oyster ( *Crassostrea gigas* ) spat. Chemosphere 87, 1335–1340. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.02.022
- Luo, L., Ke, C., Guo, X., Shi, B., Huang, M., 2014. Metal accumulation and differentially expressed proteins in gill of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) exposed to long-term heavy metal-contaminated estuary. Fish Shellfish Immunol. 38, 318–329. doi:10.1016/j.fsi.2014.03.029
- MacInnes, J.R., Calabrese, a., 1979. Combined effects of salinity, temperature, and copper on embryos and early larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 8, 553–562. doi:10.1007/BF01055036
- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H., Morin, B., 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Mar. Pollut. Bull. 64, 2663–2670. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.10.009
- Mai, H., Gonzalez, P., Pardon, P., Tapie, N., Budzinski, H., Cachot, J., Morin, B., 2014. Comparative responses of sperm cells and embryos of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to exposure to metolachlor and its degradation products. Aquat. Toxicol. 147, 48–56. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.024
- Mai, H., Morin, B., Pardon, P., Gonzalez, P., Budzinski, H., Cachot, J., 2013. Environmental concentrations of irgarol , diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster , *Crassostrea gigas*. Mar. Environ. Res. 89, 1–8.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l’impact de la pollution du Bassin d’Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

doi:10.1016/j.marevres.2013.04.003

- Maniez, C., Laug, M., 2009. Captage du CO<sub>2</sub> dans l’atmosphère, Ecole des Mines Douai.
- Manzo, S., Miglietta, M.L., Rametta, G., Buono, S., Di Francia, G., 2013. Embryotoxicity and spermotoxicity of nanosized ZnO for Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*. J. Hazard. Mater. 254-255, 1–7. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.03.027
- Mao, H., Wang, D.H., Yang, W.X., 2012a. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. Aquat. Toxicol. 110-111, 208–213. doi:10.1016/j.aquatox.2012.01.018
- Mao, H., Wang, D.-H., Yang, W.-X., 2012b. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. Aquat. Toxicol. 110-111, 208–213. doi:10.1016/j.aquatox.2012.01.018
- Marchand, M., Amouroux, I., Bédier, E., Belin, C., Claisse, D., Durand, G., Soudant, D., 2015. Qualité du Milieu Marin Littoral Synthèse Nationale de la Surveillance 2013- Edition 2015 1–60.
- Marie, V., Baudrimont, M., Boudou, A., 2006. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. Chemosphere 65, 609–617. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.01.074
- Marshall, D., 2008. Transgenerational plasticity in the sea: context-dependent maternal effects across the life history. Ecology 89, 418–427.
- Martin, M., Osborn, K.E., Billig, P., Glickstein, N., 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. Mar. Pollut. Bull. 12, 305–308. doi:10.1016/0025-326X(81)90081-3
- Mason, R.P., 2013. Trace metals and organisms: Essential and toxic metals, organometallics, microbial processes, and metal bioaccumulation, in: Trace Metals in Aquatic Systems. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, UK. pp. 370–421. doi:10.1002/9781118274576
- Maurer, D., Auby, I., Moran, A., Barbier, C., Perrière-rumèbe, M., Tournaire, M.-P., Isabelle, A., Connes, C., 2011. Reproduction de l’huître creuse dans le Bassin d’Arcachon - Année 2011. Ifremer (LER AR). 61.
- Maurer, D., Auby, I., Passoni, S., Méteigner, C., Rigouin, L., Perrière-Rumèbe, M., Tournaire, M.-P., 2013. Reproduction de l’huître creuse dans le Bassin d’Arcachon Année 2013. Ifremer 60.
- May, P., May, E., 1999. Rôles de P53 dans le cycle cellulaire, l’apoptose et le cancer. Rev. Française des Lab. 342, 41–48. doi:10.1016/S0338-9898(99)80035-3
- Meresse, M., Frostin, G., 2012. Quel avenir pour la filière ostréicole dans les régions de la façade atlantique française ? Cons. Econ. sociaux environnementaux l’Atlantique 54.
- Mermet-Bouvier, C., 2006. Caractérisation d’un nouveau récepteur à dépendance : TrkC et étude de la signification biologique de la fonction pro-apoptotique de RET dans la tumorigenèse.
- Mileikovsky, S. a., 1973. Speed of active movement of pelagic larvae of marine bottom invertebrates and their ability to regulate their vertical position. Mar. Biol. 23, 11–17. doi:10.1007/BF00394107
- Mille, D., Le Moine, O., 2011. Adaptabilités des activités conchylicoles aux modifications de leur environnement : Scénarii et solutions. La cas du bassin de Marennes-Oléron.
- Miossec, L., Deuff, R.-M. LE, Gouletquer, P., 2009. Alien species alert : *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). ICES Coop. Res. Rep. 46.
- Moal, J., Lambert, C., Moullac, G. Le, Moal, J., Lambert, C., Moullac, G. Le, 2010. Le facteur de risque

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l’impact de la pollution du Bassin d’Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

température.

- Mori, K., 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 53, 361–369. doi:10.1007/BF00391619
- Mori, R., Wang, Q., Danenberg, K.D., Pinski, J.K., Danenberg, P. V., 2008. Both  $\beta$ -actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate* 68, 1555–1560. doi:10.1002/pros.20815
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Dubreule, C., Serpentine, A., Lebel, J.M., Costil, K., 2014. Effects of acute exposures to mecoprop, mecoprop-p and their biodegradation product (2-MCP) on the larval stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 146, 165–175. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.008
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpentine, A., Lebel, J.M., Jha, A.N., Costil, K., 2013. Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 128-129, 67–78. doi:10.1016/j.aquatox.2012.12.002
- Mottin, E., Caplat, C., Latire, T., Mottier, A., Mahaut, M.L., Costil, K., Barillier, D., Lebel, J.M., Serpentine, A., 2012. Effect of zinc sacrificial anode degradation on the defence system of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Chronic and acute exposures. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 1911–1920. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.06.017
- Muñoz, I., Rosés, N., 2000. Comparison of extraction methods for the determination of atrazine accumulation in freshwater molluscs (*Physa acuta* Drap. and *Ancylus fluviatilis* Müll, *Gastropoda*). *Water Res.* 34, 2846–2848. doi:10.1016/S0043-1354(99)00394-2
- Nadella, S.R., Fitzpatrick, J.L., Franklin, N., Bucking, C., Smith, S., Wood, C.M., 2009. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossolus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 340–348. doi:10.1016/j.cbpc.2008.09.001
- Neves, M., Castro, B.B., Vidal, T., Vieira, R., Marques, J.C., Coutinho, J. a. P., Gonçalves, F., Gonçalves, a. M.M., 2015. Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecol. Indic.* 53, 220–230. doi:10.1016/j.ecolind.2015.01.031
- Newton, a., Icelly, J.D., Falcao, M., Nobre, a., Nunes, J.P., Ferreira, J.G., Vale, C., 2003. Evaluation of eutrophication in the Ria Formosa coastal lagoon, Portugal. *Cont. Shelf Res.* 23, 1945–1961. doi:10.1016/j.csr.2003.06.008
- O’Connell, P.J., Harms, C.T., Allen, J.R.F., 1998. Metolachlor, S-metolachlor and their role within sustainable weed-management. *Crop Prot.* 17, 207–212. doi:10.1016/S0261-2194(98)80011-2
- O’Connor, W.A., Lawler, N.F., 2004a. Salinity and temperature tolerance of embryos and juveniles of the pearl oyster, *Pinctada imbricata* Röding. *Aquaculture* 229, 493–506. doi:10.1016/S0044-8486(03)00400-9
- O’Connor, W.A., Lawler, N.F., 2004b. Salinity and temperature tolerance of embryos and juveniles of the pearl oyster, *Pinctada imbricata* Ro. *Aquaculture* 229, 493–506. doi:10.1016/S0044-8486(03)00400-9
- Of, S., Thesis, T.H.E., 2013. THESIS.
- Okamura, H., Aoyama, I., Liu, D., Maguire, R., Pacepavicius, G., Lau, Y., 2000. Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. *Water Res.* 34, 3523–3530.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l’impact de la pollution du Bassin d’Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Orth, R.J., Carruthers, T.I.M.J.B., Dennison, W.C., Duarte, C.M., James, W., Jr, K.L.H., Hughes, A.R., Kendrick, G.A., Kenworthy, W.J., Olyarnik, S., Short, F.T., Waycott, M., Williams, S.L., 2006. Global Crisis for Seagrass Ecosystems - Done. *Bioscience* 56, 987–996.
- Ozoh, P.T., 1992. The effect of temperature and salinity on copper body-burden and copper toxicity to *Hediste* (*Nereis*) *diversicolor*. *Environ. Monit. Assess.* 21, 11–17.
- Park, M.S., Jo, P.G., Choi, Y.K., An, K.W., Choi, C.Y., 2009. Characterization and mRNA expression of Mn-SOD and physiological responses to stresses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol. Res.* 5, 451–461. doi:10.1080/17451000802626554
- Parker, L.M., Ross, P.M., O’Connor, W. a., 2010. Comparing the effect of elevated pCO<sub>2</sub> and temperature on the fertilization and early development of two species of oysters. *Mar. Biol.* 157, 2435–2452. doi:10.1007/s00227-010-1508-3
- Peake, E., Locke, J., Tierney, L., Kolok, A., 2004. Copper tolerance in fatheadminnows: II. Maternal transfer. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 208–211.
- Perdue, J.A., Beattie, J.H., Chew, K.K., 1981. Some relationships between Gametogenic Cycle and Summer Mortality Phenomenon in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. *J. Shellfish Res.* 1, 9–16.
- Pernet, F., Barret, J., Le Gail, P., Malet, N., Pastoureau, a, Munaron, D., De Lorgeril, J., Bachère, E., Vaquer, a, Huvet, a, Corporeau, C., Normand, J., Boudry, P., Moal, J., Quéré, C., Quilien, V., Daniel, J., Pépin, J., Saulnier, D., Gonzalez, J., Bouchouca, M., 2010. Mortalité du naissain d’Huître creuse *Crassostrea gigas* dans l’étang de Thau en 2009 96.
- Pernet, F., Barret, J., Le Gall, P., Franck, L., Fiandrino, A., Huvet, A., Cordporeau, C., Boudry, P., Quéré, C., Dégremont, L., 2011. Mortalités massives de l’Huître creuse : causes et perspectives Rapport final du programme de recherche sur les mortalités d’huîtres creuses *Crassostrea gigas* dans l’étang de Thau.
- Pesando, D., Robert, S., Huitorel, P., Gutknecht, E., Pereira, L., Girard, J.P., Ciapa, B., 2004. Effects of methoxychlor, dieldrin and lindane on sea urchin fertilization and early development. *Aquat. Toxicol.* 66, 225–239. doi:10.1016/j.aquatox.2003.09.007
- Peyrefitte, M., 1993. La dynamique spatio-économique du Bassin d’Arcachon. IFREMER 1–10. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Piano, A., Asirelli, C., Caselli, F., Fabbri, E., 2002. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress Chaperones* 7, 250–257. doi:10.1379/1466-1268(2002)007<0250:HEITSO>2.0.CO;2
- Piquet, J.-C., 2014. DOCUMENT DE PRESCRIPTION « SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE » INVENTAIRE CARTOGRAPHIQUE DES POINTS DE PRELEVEMENT REMI ET DES LISTES DE ZONES CLASSEES ET SURVEILLEES 33.
- Plus, M., Dumas, F., Stanisière, J.-Y., Maurer, D., 2009. Hydrodynamic characterization of the Arcachon Bay, using model-derived descriptors. *Cont. Shelf Res.* 29, 1008–1013. doi:10.1016/j.csr.2008.12.016
- Plus, M., Maurer, D., Dumas, F., 2006. Caractérisation des composantes hydrodynamiques d’une lagune mésotidale, le Bassin d’Arcachon. PNEC – Chantier Littoral Atlantique : Mode de fonctionnement des systèmes semi-fermés du littoral Atlantique Thème 1 : Caractérisation des forçages hydrod. IFREMER 54.
- Pörtner, H.-O., Reipschlag, a, Heisler, N., 1998. Acid-base regulation, metabolism and energetics in



Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l’impact de la pollution du Bassin d’Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l’huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Sipunculus nudus as a function of ambient carbon dioxide level. J. Exp. Biol. 201, 43–55.
- Pouvreau, S., Gangnery, A., Tiapari, J., Lagarde, F., Garnier, M., Bodo, A., 2000. Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (*Bivalvia: Pteriidae*), cultivated in Takapoto atoll (French Polynesia). Aquat. Living Resour. 13, 37–48. doi:10.1016/S0990-7440(00)00135-2
- Pouvreau, S., Lepennec, M., 2006. Ecophysiologie de la reproduction chez l’huître creuse *Crassostrea gigas*.
- Przeslawski, R., Byrne, M., Mellin, C., 2015. A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. Glob. Chang. Biol. 21, 2122–2140. doi:10.1111/gcb.12833
- Quiniou, F., Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Geffard, a, Mouneyrac, C., Budzinski, H., Romeo, M., 2007. Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. Env. Int 33, 27–33. doi:S0160-4120(06)00097-3 [pii] 10.1016/j.envint.2006.06.020
- Quiniou, F., His, E., Delesmont, R., Caisey, X., 2005. Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux: bio-essai “développement embryon-larvaire de bivalve,” Méthodes d’analyse en milieu marin.
- Quiniou, F., Toularastel, F., LeFevre-Lehoerff, G., 1991. Utilisation des bioessais sur les embryons de bivalves dans le cadre d’une surveillance des effets biologiques. IFREMER 22.
- Ramachandran, S., Patel, T.R., Colbo, M.H., 1997. Effect of copper and cadmium on three Malaysian tropical estuarine invertebrate larvae. Ecotoxicol. Environ. Saf. 36, 183–188. doi:10.1006/eesa.1996.1508
- Range, P., Pilo, D., Ben-Hamadou, R., Chicharo, M., Matias, D., Joaquim, S., Oliveira, A., Chicharo, L., 2012. Seawater acidification by CO<sub>2</sub> in a coastal lagoon environment: Effects on life history traits of juvenile mussels *Mytilus galloprovincialis*. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 424, 89–98.
- Rice, C.P., Nochetto, C.B., Zara, P., 2002. Volatilization of Trifluralin, Atrazine, Metolachlor, Chlorpyrifos, -Endosulfan, and  $\hat{\alpha}$ -Endosulfan from Freshly Tilled Soil. J. Agric. Food Chem. 50, 4009–4017.
- Richardson, B.J., Mak, E., De Luca-Abbott, S.B., Martin, M., McClellan, K., Lam, P.K.S., 2008. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels “integrate” biomarker responses? Mar. Pollut. Bull. 57, 503–514. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.02.032
- Ringwood, A.H., 1992. Comparative sensitivity of gametes and early developmental stages of a sea urchin species (*Echinometra mathaei*) and a bivalve species (*Isognomon californicum*) during metal exposures. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 22, 288–295. doi:10.1007/BF00212088
- Ringwood, A.H., Brouwer, M., 1995. Patterns of metallothionein expression in oyster embryos. Mar. Environ. Res. 39, 101–105. doi:10.1016/0141-1136(94)00042-N
- Rivard, L., 2003. Environmental Fate of Metolachlor. Environ. Monit. Branch Dep. Pestic. Regul. 14.
- Robert, R., His, E., 1981. Action de 1 1 acetate de tributyle -étain sur les oeufs et les larves D de deux mollusques d ’intérêt commercial : *Crassostrea gigas* (Thunberg ) et *Hytilus galloprovincialis* (Lmk). Com. la Maric. 42, 1–16.
- Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals 22.
- Rollin, C., Quiot, F., 2006. Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- métalliques dans les sols et les eaux souterraines, Rapport INERIS-DRC. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Ruesink, J.L., Hunter, S.L., Trimble, A.C., KimberlyW. Heiman, FiorenzaMicheli, J.E.B., Kay, and M.C., 2005. INTRODUCTION OF NON-NATIVE OYSTERS: Ecosystem Effects and Restoration Implications.
- Ruttikay-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R., 2013. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6044–6066. doi:10.3390/ijms14036044
- Salvo, F., 2010. Approche comparée des populations naturelles et cultivées d'huître japonaise *Crassostrea gigas* dans une lagune macro-tidale (Bassin d'Arcachon) : cycle biologique, relations trophiques et effets sur le benthos 4, 510.
- Schroeder, H. a, Nason, a P., Tipton, I.H., Balassa, J.J., 1966. Essential trace metals in man: copper. *J. Chronic Dis.* 19, 1007–1034. doi:10.1016/0021-9681(70)90056-1
- Scourzic, T., Loyen, M., Fabre, E., Tessier, A., Dalias, N., Trut, G., Maurer, D., Simonnet, B., 2011. Evaluation du stock d'huîtres sauvages et en élevage dans le Bassin d'Arcachon.
- Shi, Y., 2002. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Mol. Cell* 9, 459–470. doi:10.1016/S1097-2765(02)00482-3
- Shine, J.P., Wallace, G.T., 1995. the Formation of Surface-Active Organic-Complexes of Copper in Coastal Marine Waters. *Mar. Chem.* 51, 145–157. doi:10.1016/0304-4203(95)00050-2
- SIBA, 2013. Rapport annuel 2013 sur le prix et la qualité des services publics de l'assainissement collectif et non collectif 112.
- Song, Y.P., Suquet, M., Quéau, I., Lebrun, L., 2009. Setting of a procedure for experimental fertilisation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. *Aquaculture* 287, 311–314. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.018
- Srinivasan, M., Swain, G.W., 2007. Managing the Use of Copper-Based Antifouling Paints. *Environ. Manage.* 39, 423–441. doi:10.1007/s00267-005-0030-8
- Suquet, M., Amourda, C., Mingant, C., Quéau, I., Lebrun, L., Brizard, R., 2007. Setting of a procedure for experimental incubation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. *Aquaculture* 273, 503–508. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.018
- Suquet, M., Mercier, A. Le, Rimond, F., Mingant, C., Haffray, P., Labbe, C., Iroise, T.B., 2012. Setting tools for the early assessment of the quality of thawed Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) D-larvae. *Theriogenology* 78, 462–467.
- Tagu, D., Moussard, C., 2003. Principes des techniques de biologie moléculaire, in: *Principes Des Techniques de Biologie Moléculaire*. p. 176.
- Tettlebach, S.T., Rhodes, E.W., 1981. Combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the Northern Bay scallop *Argopecten irradians irradians*. *Mar. Biol.* 63, 249–256.
- Thakkar, M., Randhawa, V., Wei, L., 2013. Comparative responses of two species of marine phytoplankton to metolachlor exposure. *Aquat. Toxicol.* 126, 198–206. doi:10.1016/j.aquatox.2012.10.002
- Thiyagarajan, V., Ko, G.W.K., 2012. Larval growth response of the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*) to multiple climate change stressors. *Aquaculture* 370-371, 90–95. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.09.025

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Thomas-Guyon, H., Gagnaire, B., Bado-Nilles, A., Bouilly, K., Lapègue, S., Renault, T., 2009. Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Dev. Comp. Immunol.* 33, 653–659. doi:10.1016/j.dci.2008.11.011
- Trenkamp, S., Martin, W., Tietjen, K., 2004. Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty acid elongases from *Arabidopsis thaliana* by different herbicides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11903–11908. doi:10.1073/pnas.0404600101
- Turner, A., 2010. Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 159–171. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.12.004
- Untersee, S., Pechenik, J.A., 2007. Local adaptation and maternal effects in twospecies of marine gastropod (*Crepidula*) that differ in dispersal potential. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 347, 79–85.
- Van der Werf, H.M.G., 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agric. Ecosyst. Environ.* 60, 81–96.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, 1–12. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Ventura-Lima, J., Sandrini, J.Z., Cravo, M.F., Piedras, F.R., Moraes, T.B., Fattorini, D., Notti, A., Regoli, F., Geracitano, L. a., Marins, L.F.F., Monserrat, J.M., 2007. Toxicological responses in *Laeonereis acuta* (annelida, polychaeta) after arsenic exposure. *Environ. Int.* 33, 559–564. doi:10.1016/j.envint.2006.09.016
- Verkhovskiy, M.I., Belevich, I., Bloch, D. a., Wikström, M., 2006. Elementary steps of proton translocation in the catalytic cycle of cytochrome oxidase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1757, 401–407. doi:10.1016/j.bbabi.2006.05.026
- Verween, a., Vincx, M., Degraer, S., 2007. The effect of temperature and salinity on the survival of *Mytilopsis leucophaeata* larvae (Mollusca, Bivalvia): The search for environmental limits. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 348, 111–120. doi:10.1016/j.jembe.2007.04.011
- Viarengo, A., Accomando, R., Ferrando, I., Beltrame, F., Fato, M., Marcenaro, G., 1996. Heavy metal effects on cytosolic free Ca<sup>2+</sup> level in the marine protozoan *Euplotes crassus* evaluated by confocal laser scanning microscopy. *Comp. Biochem. Physiol. C-Pharmacology Toxicol. Endocrinol.* 113, 161–168.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 146, 281–300. doi:10.1016/j.cbpc.2007.04.011
- Waddington, C., 1942. Canalisation of development and the inheritance of acquired characters. *Group* 563–565.
- Waeles, M., Riso, R.D., Cabon, J.Y., Maguer, J.F., L'Helguen, S., 2009. Speciation of dissolved copper and cadmium in the Loire estuary and over the North Biscay continental shelf in spring. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84, 139–146. doi:10.1016/j.ecss.2009.06.011
- Ward, L.G., Kemp, W.M., Boyton, W.R., 1984. The influence of waves and seagrass communities on suspended particulates in an estuarine embayment. *Mar. Geol.* 59, 85–103. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Warner, K., Frankel, E., 1987. Effects of B-Carotene on light stability of soybean oil 64, 213–218.

Chapitre 5 –Analyse multifactorielle de l'impact de la pollution du Bassin d'Arcachons sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse Japonaise prélevée *in situ*

- Watermann, B.T., Herlyn, M., Daehne, B., Bergmann, S., Meemken, M., Kolodzey, H., 2008. Pathology and mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in 2005 at the East Frisian coast, Germany. *J. Fish Dis.* 31, 621–630. doi:10.1111/j.1365-2761.2008.00953.x
- Waycott, M., Duarte, C.M., Carruthers, T.J.B., Orth, R.J., Dennison, W.C., Olyarnik, S., Calladine, A., Fourqurean, J.W., Heck, K.L., Hughes, Ar., Kendrick, G.A., Kenworthy, Wj., Short, F.T., Williams, S.L., 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 12377–12381. doi:10.1073/pnas.0905620106
- Weisshaar, H., Böger, P., 1987. Primary effects of chloroacetamides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 28, 286–293. doi:10.1016/0048-3575(87)90027-7
- Weisshaar, H., Retzlaff, G., Ger, P.B., 1988. Chloroacetamide Inhibition of Fatty Acid Synthesis Chloroacetamides are an established preemergent herbicide class ; their mode of action , however , has still to be elucidated . Cell metabolism is generally disturbed , and the most pronounced effects are 216, 212–216.
- Weng, N., Wang, W., 2014a. Improved tolerance of metals in contaminated oyster larvae. *Aquat. Toxicol.* 146, 61–69. doi:10.1016/j.aquatox.2013.10.036
- Weng, N., Wang, W.X., 2014b. Improved tolerance of metals in contaminated oyster larvae. *Aquat. Toxicol.* 146, 61–69. doi:10.1016/j.aquatox.2013.10.036
- Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., Akcha, F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[alpha]pyrene, 17 alpha-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.* 85, 133–142. doi:DOI 10.1016/j.aquatox.2007.08.007
- Wisely, B., Blick, R., 1967. Mortality of marine invertebrate larvae in mercury, copper, and zinc solutions. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 18, 63 – 72.
- Wolins, N.E., Brasaemle, D.L., Bickel, P.E., 2006. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett.* 580, 5484–5491. doi:10.1016/j.febslet.2006.08.040
- Wu, S., Lin, H., Yang, W., 2008. The effects of maternal Cd on the metallo-thionein expression in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae. *Aquat. Toxicol.* 87, 296–302.
- Xu, D., Wen, Y., Wang, K., 2010. Effect of chiral differences of metolachlor and its (S)-isomer on their toxicity to earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1925–1931. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.07.035
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54. doi:10.1038/nature11413
- Zhang, Z., Xiaoxu, L., Vandeppeer, M., Zhao, W., 2006. Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256, 502–509.

Certains polluants présents dans les eaux du Bassin d’Arcachon provoquent des effets embryotoxiques dès les concentrations environnementales, qu’il s’agisse de larves issues d’huîtres natives du Bassin, sauvages ou cultivées, ou en provenance d’écloserie. Partant de ce constat, nous ne pouvons que nous interroger sur les effets de ces polluants couplés à d’autres facteurs abiotiques que sont la salinité et la température. Les diminutions de salinité et les changements de températures modifient la toxicité potentielle du cuivre et du S-métolachlore. Cependant, sous l’effet des conditions environnementales représentatives de celles rencontrées dans le Bassin d’Arcachon en période de reproduction, ou de conditions futures, quel serait l’impact de l’ensemble de ces paramètres sur le développement des embryons de l’huître creuse ?

---

Chapitre 6 - ANALYSE DE L'IMPACT DE CONDITIONS  
PRÉSENTES ET FUTURES DE TEMPÉRATURES, SALINITÉ ET  
DE CONCENTRATIONS EN CONTAMINANTS DANS LES  
EAUX DU BASSIN D'ARCACHON SUR LE DEVELOPPEMENT  
EMBRYO-LARVAIRE DE L'HUÎTRE CREUSE JAPONAISE

---

*Chapitre 6. Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, de salinités et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryolaire de l'huître creuse Japonaise*

A l'échelle du Bassin d'Arcachon, les conditions réunies au moment de la période de reproduction ne sont pas équivalentes aux conditions optimales de développement préconisées dans la normalisation du test embryolaire. De plus, le changement global est un fait reconnu par la communauté scientifique. Dans le Bassin, des événements extrêmes sporadiques de salinité et de température ont déjà eu lieu dans les années antérieures en période de reproduction allant dans le sens des prédictions du GIEC.

C'est pourquoi, dans ce chapitre, la réponse des larves D à des conditions environnementales en salinité et températures mais aussi en polluants a été étudiée. En parallèle, les embryons issus des mêmes géniteurs ont été utilisés pour étudier l'impact de salinité et température qu'il serait possible de rencontrer dans le futur dans les eaux du Bassin d'Arcachon, couplé à un mélange de cuivre et de métolachlore à des concentrations supérieures aux doses moyennes environnementales, bien que déjà rencontrées dans le milieu.

**1. Article 5 : Sensibilité des embryons de l'huître creuse Japonaise *Crassostrea gigas* exposés à des conditions environnementales présentes et futures.**

Les premiers stades de vie des organismes marins sont potentiellement vulnérables à certains facteurs en lien avec le changement climatique planétaire. Peu d'études toxicologiques se sont intéressées jusqu'à présent à l'effet des changements de températures couplés aux salinités sur les stades embryonnaires ou larvaires des huîtres (Damiens et al., 2004; Dos Santos et Nascimento, 1985; His et al., 1989b; O'Connor et Lawler, 2004a; Dove et O'Connor, 2007). L'objectif est donc d'étudier les effets combinés de l'exposition à des pesticides (cuivre et S-métolachlore), à des salinités décroissantes et des températures élevées, scénario environnemental attendu dans l'avenir avec le changement climatique mondial dans de nombreux écosystèmes côtiers comme la lagune du Bassin d'Arcachon. Ces résultats seront comparés à ceux obtenus dans les conditions environnementales actuelles dans le milieu (salinité, température et polluants). L'objectif est de fournir une meilleure compréhension de la façon dont le changement climatique impactera les processus écosystémiques. Pour cela, des embryons obtenus à partir de géniteurs d'écloserie ont été exposés à 24 °C avec une salinité de 33 u.s.i : conditions optimales de développement ; à 22 °C avec une salinité de 33 u.s.i en présence de 3 µg.L<sup>-1</sup> de cuivre et 10 ng.L<sup>-1</sup> de métolachlore : conditions environnementales actuelles ; ou à 26 °C avec une salinité de 24 u.s.i en présence de 6 µg.L<sup>-1</sup> de cuivre et 40 ng.L<sup>-1</sup> de métolachlore : conditions futures. Le pourcentage de malformations larvaires a été dénombré, en faisant une distinction entre chaque type d'anormalités. Les résultats acquis ont montré une augmentation significative du pourcentage de malformations larvaires d'un facteur six aux conditions environnementales présentes et d'un facteur neuf aux conditions futures en comparaison des conditions optimales de développement. Dans les conditions actuelles du bassin d'Arcachon, environ 40 % des larves arrivent à se développer normalement, les autres présentent des anomalies du manteau. Dans le scénario futur, une majorité d'arrêt de développement et d'anomalie du manteau a été observée.



Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryolaire de l'huître creuse Japonaise

## **Sensitivity of oyster embryos of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* to present and future environmental conditions**

Perrine Gamain<sup>1</sup>, Patrice Gonzalez<sup>1</sup>, Nicolas Mazella<sup>2</sup>, Bénédicte Morin<sup>1</sup>, Jérôme Cachot<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univ. Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

<sup>2</sup> IRSTEA, URRBEX (Water research Unit), 50 avenue de Verdun, Gazinet, 33612 Cestas Cedex France

### **ABSTRACT**

Early life stages of marine organisms are potentially vulnerable to certain stressors associated with global change. The response of embryo-larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, to copper and metolachlor at various salinity-temperature regimes was studied in the laboratory. These two pollutants were selected because of their high occurrence in the water bodies of the Arcachon Bay. The impact of optimal, present and future environmental conditions in the Arcachon Bay was tested. Freshly fertilized embryos were cultured at 24 °C in seawater at 33 u.s.i (ideal condition), at 22°C in seawater at 33 u.s.i in the presence of 3 µg.L<sup>-1</sup> of copper and 10 ng.L<sup>-1</sup> of metolachlor (current environmental conditions) or at 26 °C in seawater at 24 u.s.i in the presence of 6 µg.L<sup>-1</sup> of copper and 40 ng.L<sup>-1</sup> of metolachlor (future conditions). Embryotoxicity was measured by considering the percentage of abnormal D-shaped larvae. A distinction between each abnormality type was done. The results demonstrated significant increase in larval abnormalities in present exposure condition by a factor six and even more at future exposure condition (by a factor nine) in comparison to optimal conditions. These results may provide answers to the oyster crisis encountered in recent years in the Arcachon bay. Moreover, the future scenario provide a better understanding of how climate change will modulate oyster D-larvae sensitivity to pollutants and how it can arrest development by impairing segmentation.

**Key words** : *Crassostrea gigas*, embryo-larval development, multiple stress factors, climate change, pollutants, current and future trends

## Introduction

Over the last century, there has been a 0.74 °C rise in surface ocean temperature (Hoegh-Guldberg et al., 2007) and it is anticipated that for 2100, ocean temperature would increase by 0.6 to 2 °C (IPCC, 2013). Simultaneously, heavy precipitations induced by climate change in some parts of the world is expected to reduce surface salinity (Groisman et al., 1999). Salinity and surface temperature are two major factors affecting growth rate and survival of bivalve larvae (Brenko and Calabrese, 1969; Doroudi et al., 1999; His et al., 1989a; Tettlebach and Rhodes, 1981). Elevated temperatures due to long term trend of global climate change might cause threat to the development of bivalve species (Dos Santos et Nascimento, 1985; Helm and Millican, 1977). Only few studies were interested in the effect of temperature coupled to salinity on different oyster species at embryonic or larval stage (Damiens et al., 2004; Dos Santos et Nascimento, 1985; His et al., 1989b; O'Connor et Lawler, 2004a; Dove et O'Connor, 2007). Similar studies of temperature-salinity effects have been performed on several other bivalve species, including mussel (Hrs-Brenko and Calabrese, 1969; Hrs-Brenko et al., 1977; Liang Liang et al., 2009), *Argopecten irradians irradians* (Tettlebach and Rhodes, 1981), *Mytilopsis leucophaeata* (Verween et al., 2007), *Mulinia lateralis* (Calabrese, 1969), *Adula californiensis* (Lough and Gonor, 1971). Increased interest in aquaculture in recent years has led to further investigations of various commercially important organisms, including several bivalve mollusks like the Japanese oysters *Crassostrea gigas*. The aim is to support and to sustain an economically important population. Because of their way of life bivalve species are exposed to a wide range of environmental stressors including anthropogenic (such as water pollution) and natural factors (variation of temperature or salinity) (Lannig et al., 2006). Oyster is a bivalve mollusk with a high tolerance to changes in environmental conditions. It is described as a euryhaline species since it can live for optimum salinities between 20 u.s.i and 25 u.s.i, but can survive at higher salinities to 35 u.s.i (FAO, 2015). This species is also eurythermal since it is able to withstand wide range of temperatures between 1.8 °C and 35 °C (FAO, 2015). But in the context of global warming, environmental parameters might change and be far away from oyster development optimal conditions. Furthermore, it is during the critical embryonic and larval stages that marine organisms such as oysters are most susceptible to environmental changes (MacInnes and Calabrese, 1979; Parker et al., 2010). In fact, metamorphosis is a crucial step in the life cycle of bivalve species (Hadfield, 2000; Ko et al., 2014). The different processes involved in metamorphosis of embryos into D-larvae could be in close relationship with climate factor (Ko et al., 2014). However, climate change is not the only stressor in natural environment (Ko et al., 2014) and pollutants could also represent a threat for bivalves. Among the several pollutants encountered in aquatic ecosystems, heavy metals (e.g. copper) represent one of the most widespread and serious

form of environmental contamination (Devi et al., 1996). Among these, lagoon ecosystems like Arcachon bay (SW France) are impacted by contamination. This lagoon has a naturally reproducing population of oysters. The mean copper (Cu) concentrations in the Arcachon Bay may vary from 0.6  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  to 4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  during oysters breeding period (Gamain et al., publi 2). Moreover, among the different pesticides currently measured S-metolachlor dominate the Arcachon bay's contamination with concentration at around 10  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (Auby et al., 2007; Budzinski et al., 2011). Arcachon bay is considered to have excellent potential for aquaculture (Miossec et al., 2009). However, since 1998, several years have been particularly unfavorable for Japanese oyster larval recruitment and high mortality of oyster spat have been recorded. Previous researches tried to understand which parameters could be responsible of oysters crises (Mai et al., 2012, 2013, 2014; Gamain et al., 2016). The impact of two major abiotic parameters temperature and salinity were studied in the presence of selected contaminants. Elevated temperature of 28°C coupled to copper or metolachlor (Gamain et al., 2016c) have an impact on the embryo-larval development of *Crassostrea gigas*. Moreover, previous works have shown the synergistic effect of low salinity and metolachlor or copper on the embryo-larval development of *C. gigas* (Gamain et al., 2016). But to our knowledge only one study have investigated the combined effects of temperature, salinity and copper on embryos of the American oyster *Crassostrea virginica* (MacInnes and Calabrese, 1979) and none with the metolachlor. Therefore, combination of pesticide exposure, low salinity and elevated temperature is an environmentally relevant scenario in many continental ecosystems, which is expected to become more widespread in the future with global climate change. The aim of this work is to study the interactive effect of temperature, salinity, copper and S-metolachlor on D-larvae of the Pacific oyster *C. gigas* to provide a better understanding of how climate change will impact ecosystem processes. The response of D-larvae from a commercial hatchery to this future conditions will be compared to present and ideal conditions.

### 1. Materials and methods

The influence of salinity, temperature and pollutants on the development of embryos to D-larvae (i.e 1 day old larvae) was investigated. The embryo-toxic effects were examined in the laboratory through the standardized acute 24h tests (AFNOR, 2009).

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryolaire de l'huître creuse Japonaise

### 1.1. Brood stock

Mature Japanese oysters (*C. gigas*, Thunberg, 1793) came from a commercial hatchery specialized in the production of mature oysters year-round (Guernsey Sea Farms, UK). Oysters were kept at around 10 °C for transportation and then acclimatized in filtered sea water (FSW) on arrival to the laboratory before the beginning of experiments. All oysters were used immediately. Natural seawater was collected in the Arcachon Bay (SW France) near the Banc d'Arguin which is a location diluted by ocean contribution. Immediately after sampling, seawater was filtered using membrane filter of 0.45 µm and then 0.2 µm (Xilab) to eliminate debris and microorganisms. Filtered seawater (FSW) was stocked at 4 °C in the dark and was used within 3 days. A few hours before experiment, FSW was filtered again at 0.2 µm. This reference water was chemically analyzed for pollutant concentration determination.

### 1.2. Spawning and fertilization

Prior to each experiment, the salinity of the reference sea water was measured using a salinity probe (Wissenschaftlich Technische Werkstätten Multi 340i, sonde TetraCon 325). From this original salinity (33 u.s.i), dilutions using ultra-pure water were performed to obtain the final expected salinity of 24. This salinity was chosen according to those recorded from 2007 to 2014 (regional network ARCHYD) in two sites of the Arcachon Bay. Salinity ranged from 24 to 33 during oyster breeding period. 24 u.s.i was an exceptionally low salinity but with global change, salinity might progress in this way. Temperatures were chosen according to those recorded from 2007 to 2014 (Archyd) in two points in Arcachon Bay. Temperature ranged from 18.2 °C to 26 °C during summer. Temperature the most encountered during oyster breeding period was 22 °C. Table 1 presents the various conditions selected in this study.

Males and females were induced to spawn by thermal stimulation, alternating immersion in FSW of 15 °C and 28 °C for 30 min. Spawning males and females were individually isolated in beakers with 0.2 µm FSW. They were left undisturbed for 15 min and were then removed from beakers. Eggs and sperm from two individuals were selected to give a single pairing. Sperms and eggs were sieved separately through a 50 µm and 100 µm meshes (Sefar Nitex), respectively to eliminate debris and faeces. Sperm mobility was checked and the number of eggs was counted under a microscope (LEICA DME) at a magnification of 100. Eggs were fertilized with sperm in ratio of 1:10 (egg:sperm) homogenizing with an agitator to prevent polyspermy. Fertilization success was checked under microscope, and embryos were then counted and transferred to 24-well microplate (Greiner Bio-One, Cellstar free of detectable DNase, RNase, human DNA and pyrogens) for embryotoxicity assays. The embryotoxicity assay has been described in details by His et al. (1997), and recently normalized (AFNOR, 2009). Fertilized eggs (around 250 eggs) were exposed in wells containing 2 ml of toxicant solution. The egg density was

slightly changed compared to the one recommended in the AFNOR guideline specifying densities between 20 000 and 50 000 embryos per liter. These microplates were incubated at 22, 24 or 26 °C for 24 h in the dark.

After incubation, 25 µl of 1% buffered formalin were added and the percentage of abnormal oyster larvae was recorded. Hundred individuals per well were directly observed under an inverted microscope (Nikon eclipse TS100/TS100-F) to determine the number of abnormal D-shell larvae according to the criteria described in His et al. (1997) and AFNOR (AFNOR, 2009). Convex hinge, incomplete shell, scalloped shell, mantle abnormality and developmental arrest were recorded and the percentage of each abnormality was calculated. An important prerequisite for the validation of the assay is the occurrence of less than 20% abnormal larvae in control conditions (24 °C in the absence of contamination). Furthermore, the EC<sub>50</sub> value for Cu<sup>2+</sup> should be between 6 and 16 µg.L<sup>-1</sup>. In this experimentation, two different couples were used and four replicates were performed for each condition.

Table 1: Exposure conditions for the three studied parameters temperature (°C), salinity (u.s.i) and contaminant (Copper: Cu or S-metolachlor: Met)

	Temperature (°C)	Salinity (u.s.i)	Contaminant (nominal concentrations)
Control	24	33	/
Present	22	33	Cu 3 µg.L <sup>-1</sup>
			Met 10 ng.L <sup>-1</sup>
Future	26	24	Cu 6 µg.L <sup>-1</sup>
			Met 40 ng.L <sup>-1</sup>

### 1.3. Metal and pesticide solutions

Reference toxicants (CuSO<sub>4</sub> and S-metolachlor) and formalin were purchased from Sigma–Aldrich Chemical (St. Quentin Fallavier, France). Experimental concentrations were chosen on the basis of preliminary studies (Mai et al., 2012, 2014, Gamain et al., 2016). The metal and pesticides solutions were made up from analytical grade copper sulfate (CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O) and S-metolachlor. Working solutions were obtained diluting the stock solutions (100 mg.L<sup>-1</sup> for copper and 250 mg.L<sup>-1</sup> for metolachlor) in FSW. Two levels of pollutant contamination were tested: 3 µg.L<sup>-1</sup> and 10 ng.L<sup>-1</sup> or 6 µg.L<sup>-1</sup> and 40 ng.L<sup>-1</sup> for Cu and metolachlor respectively (Table 1). These concentrations were selected on the basis of seawater analysis in three points of the Arcachon Bay during oyster breeding period. Exceptionally high values were recorded of 34.8 ± 7.9 ng.L<sup>-1</sup> (Repar, 2013). Thus, metolachlor concentration of 40 ng.L<sup>-1</sup> was chosen for future condition. Currently, Cu concentrations in the Arcachon Bay vary from 0.6 µg.L<sup>-1</sup> to 4 µg.L<sup>-1</sup> during oysters breeding period (Gamain et al., publi 2). A

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Japonaise

nominal concentration of  $6 \mu\text{g.L}^{-1}$  was selected because of the continuous increase of copper concentration in the Arcachon Bay.

The working solutions were chemically analyzed for pollutant concentrations determination. For chemical analysis of copper at 3 and  $6 \mu\text{g.L}^{-1}$ , each seawater sample was acidified with 5% final of nitric acid (Nitric acid 65%, Fluka). Samples were then analyzed by Inductively-Coupled Plasma Optic Emission Spectrometry (ICP-OES, Vista Pro, Agilent Technologies) and by Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS, Xseries2, Thermofisher Scientific). The standards solutions were prepared from a multielementary calibration solution (Astasol-Mix M010, Analytika, Czech Republic), in a seawater certified solution (NASS-6 from NRCC-CNRC, Ottawa, Canada). The samples were diluted in a 3% final nitric acid solution (made from a nitric acid 65% FisherScientific Trace Metal Grade solution) 1:2 (v/v) for ICP-OES analysis and 1:3 (v/v) for ICP-MS analysis. Quantification limit were  $10\mu\text{g.L}^{-1}$  (ICP-OES) and  $0.3\mu\text{g.L}^{-1}$  (ICP-MS).

Analysis of metolachlor concentrations are in progress.

#### 1.4. Statistical analysis

All data are expressed as means  $\pm$  standard error (S.E.). Data were first processed using the transformation:  $p' = \arcsin \sqrt{p}$ . P correspond to the raw data (percentage of abnormalities) specified in p values from 0 to 1 (Legendre and Legendre, 1998). Data were not normal, homogeneity of variance (Levene's test) was verified and then statistical analysis was performed by the Kruskal-Wallis tests. Differences among tested concentration means were then performed using Kruskal post hoc test. Significance was accepted when  $p < 0.05$ .

## 2. Results

### 2.1. Chemical analysis of tested pollutant solution

Table 3 shows copper concentration in control conditions and in the contamination solutions. Analyses revealed the presence of copper in reference seawater at concentrations  $< 2.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ . At the nominal concentration of  $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ , concentration were slightly higher than expected ( $4.25 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). At  $6 \mu\text{g.L}^{-1}$  the measured concentration was very close to the expected value (variation range of 1.5 %).

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryolaire de l'huître creuse Japonaise

Table 3: Copper ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) and metolachlor ( $\text{ng.L}^{-1}$ ) concentrations determined for reference seawater from the Arcachon Bay and solutions of contamination

	Copper			S-metolachlor
Nominal concentrations	Control	3	6	Control
Measured concentrations	2.45	4.25	5.91	

## 2.2. Larval abnormalities

There is less than 20 % of larval abnormalities in control conditions. Moreover, the percentage increases significantly for the different study conditions. At present study conditions, there is around 60% of larval abnormalities and more than 90 % for future conditions (Fig. 1).

In control conditions, a majority ( $86.4 \% \pm 5.3$ ) of the D-larvae develop normally. In the present Arcachon Bay conditions,  $62.6 \% \pm 6.4$  larvae were abnormal with mantle abnormality being predominant counting  $37.75 \% \pm 6.8$  of total larval abnormalities. In future scenario, abnormal larvae will reach  $93.1 \% \pm 3.5$  with a majority of developmental arrest recorded ( $48.9 \% \pm 15.9$ ) and to a lesser extent mantle abnormality ( $33.9 \% \pm 10.3$ ) (Fig. 2).

## 3. Discussion

In the present work, Cu concentration in the reference sea water was around  $2.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ . In our previous studies, Cu concentration was detected at concentrations ranging between 0.6 and  $4 \mu\text{g.L}^{-1}$  during oyster breeding period in Arcachon bay water (Gamain et al., public 2). So present Cu concentration measured are representative of what is currently observed in water bodies of the Arcachon bay. In the past, mean environmental concentration of Cu in the Arcachon bay was about  $0.7 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Geffard et al., 2002). About ten years later, Cu concentration has increased approximately to  $1.1 \mu\text{g.L}^{-1}$  beyond oysters breeding period and to  $3.7 \mu\text{g.L}^{-1}$  during oysters breeding period (Gamain et al., 2016 article 2). Parallel to the increase of Cu levels in the water column, Cu body burden in oysters of the Arcachon bay have shown an increasing trend since the beginning of 2000 with concentrations up to more 400 mg/kg dry weight (ROCCH, 2015). So we can reasonably expect a concentration of  $6 \mu\text{g.L}^{-1}$  in the future.

The success of shellfish aquaculture is greatly driven by the performance of early life stages, such as embryo and larvae stages (Ko et al., 2014; Kroeker et al., 2010). However, for several years, the oyster sector have faced several crisis. In many countries worldwide, the occurrence of significant mass mortalities in both adult and juvenile of *C. gigas* populations has been reported (Cotter et al., 2010a; Mori, 1979; Perdue et al., 1981; Pernet et al., 2011, 2010; Watermann et al., 2008). *C. gigas* mortalities

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryolaire de l'huître creuse Japonaise

have generally been reported during the summer months. Oyster living conditions may be the cause of these crises. A large variety of environmental pollutants are released into lakes, rivers and finally into coastal areas like the Arcachon bay (Gomiero and Viarengo, 2014). At the same time, temperature or salinity has been shown to modify the chemistry of a number of organic and inorganic pollutants and their toxicity for aquatic organisms (Gamain et al., 2016c, 2016d; Lannig et al., 2006; MacInnes and Calabrese, 1979; Ozoh, 1992). In the wild, marine organisms are subjected to fluctuating environmental conditions which are often not optimal and which affect the pollutant's toxicity (MacInnes and Calabrese, 1979). Ideal conditions for *C. gigas* embryo-larval development are salinity of 33 u.s.i and temperature of 24 °C (AFNOR, 2009, His et al., 1997, Gamain et al. publi 1 et 3). In these conditions, our data show less than 20 % of larval abnormalities ( $13.6 \% \pm 5.3$ ) which confirm the optimal conditions of culture.

In the present work, the effects of lower, but commonly encountered temperature (22 °C, regional network Archyd) and salinity (33 u.s.i) in the Arcachon bay during oyster breeding period, on D-larvae development was studied coupled to environmental concentration of Cu and S-metolachlor. Results have shown a significant increase of the percentage of larval abnormalities by a factor five compare to optimal conditions ( $62 \% \pm 6$  vs  $13 \% \pm 5$  respectively). A previous study on the effect of temperature at 33 u.s.i coupled to Cu or metolachlor on embryos of *C.gigas* from a commercial hatchery has been conducted (Gamain et al., 2016). Temperature effect was tested from 20°C to 30°C in the absence of contamination (20, 22, 24, 26, 28 and 30 °C). The effect of temperature coupled to copper or metolachlor was tested at 20 °C, 24 °C or 28 °C. It was shown that culture at 22 °C had no significant effect on Japanese oyster embryo-larval development in control exposure conditions. In the presence of copper or metolachlor, there was a significant increase of the percentage of larval abnormalities at 20 °C in comparison to the control at 20 °C without pollutant. These results are in agreement with our study. Experiments carried out with embryos of the Pearl oyster *P. imbricata* incubated at salinities from 15 to 35 u.s.i and temperature from 14 to 26 °C, have shown embryo development was possible for salinities > 30 u.s.i and temperature > 20 °C. In this value range, more the salinity and temperature increase more the percentage of normal D-larvae increase. At 35 u.s.i, the optimal salinity for D-larvae development of this species, the percentage of normally developed D-larvae decrease with decreasing temperature (O'Connor and Lawler, 2004a). This is in accordance with our results for actual environmental conditions in the Arcachon Bay.

Actually, only a little percentage of larval supply achieved settlement. Indeed, 0.17 % between small larvae and fixing stage represents a good survival rate in the Arcachon Bay (Auby et al., 2014), and 2%



Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Japonaise

is considered as an excellent survival rate (Maurer et al., 2013). Actual conditions of temperature, salinity and contamination in the Arcachon Bay induce up to 40% of mantle abnormalities. Abnormalities affecting the mantle will impair normal growth and development of the shell and then appearing more severe than shell abnormalities. Given the low percentage of larvae reaching the fixing stage, we can assume that this type of abnormalities largely contribute to the disappearance of larvae before the recruitment stage.

A second experiment was conducted to mimic potential ecotoxicological effects induced by climate in the coming centuries, with higher temperature (26 °C) and lower salinity (24 u.s.i). These two parameters were studied in combination with two representative pollutants from the Arcachon Bay. Increasing temperature, decreasing salinity and increasing concentration of pollutants increased significantly the percentage of larval abnormalities up to 90 %. So there was a seven-fold increase of abnormal larvae in comparison to ideal condition ( $93.1 \pm 3.5$  vs  $13\% \pm 5$  respectively). Previous researches anticipated that dilution of seawater by fresh water would increase the toxicity of heavy metals such as Cu to marine and estuarine organisms (Gamain et al., 2016d; Ozoh, 1992) or pesticide such as S-metolachlor (Gamain et al., 2016a). Moreover, the salinity-tolerance of oyster embryos can vary with temperature (Dos Santos and Nascimento, 1985). High temperatures associated to low salinity were shown to increase accumulation and toxicity of copper on the nereis *Hediste diversicolor* (Ozoh, 1992). Elevated temperature at low salinity decrease the percentage fertilization of *Parechinus angulosus* (Greenwood, 1981). Dos santos and Nascimento (1985) found that *Crassostrea rhizophorae* larvae are more tolerant to salinity variations (between 20 and 40 u.s.i) at the optimal temperature of development than at elevated temperatures. So increasing temperatures reduces tolerance to salinity. In addition, we have shown that, increasing temperatures or lower salinities increase Cu and S-metolachlor toxicity (Gamain et al., 2016a, 2016b). It has been demonstrated that those physical stress can affect marine invertebrate defense mechanisms like phagocytose (Cheng and Combes, 1990). The S-metolachlor belongs to the family of chloroacetamides, a pesticide family which can inhibit protein synthesis resulting in reduction of normal development of organisms (Weisshaar and Böger, 1987; Weisshaar et al., 1988). Cu in small quantities is essential to marine life (Gomiero and Viarengo, 2014) for the normal growth and metabolism (Carbonell and Tarazona, 1994; Schroeder et al., 1966). Cu is part of several essential enzymes including, dopamine beta-hydroxylase (catecholamine production), copper-zinc superoxide dismutase (free radical detoxification), and cytochrome oxidase and ceruloplasmin (iron conversion) (Aaseth and Norseth, 1986). However, Cu turns to be toxic at high concentrations depending on organism specific tolerance. A significant portion of copper's toxicity comes from its ability to accept or give electrons as it changes oxidation state. This catalysis the

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryolaire de l'huître creuse Japonaise

formation of hydroxyl free radical in the Fenton (Flemming and Trevors, 1989) and metal-catalyzed Haber–Weiss reactions, resulting in oxidative DNA damage and DNA strand excision (Lesser, 2006). All of these processes may induce organisms to lose health status due to reduce replication rate or endocytosis rate (Gomiero and Viarengo, 2014). Cu excess has also been shown to disrupt lysosome functionality (Viarengo et al., 1996). Increase temperature was also reported to significantly induce lysosomal membrane destabilization in haemocytes of oysters (Zhang et al., 2006). But for salinity, haemocytes are resistant cells because only high values of salinity kill them (45 u.s.i) (Gagnaire et al., 2006).

Combination of exposure to increasing pesticide concentrations, low salinity and elevated temperature is an environmentally relevant scenario in many continental and coastal ecosystems. This scenario is expected to become more likely in the future with global climate change. In comparison to present exposure conditions, an increase of 32 % of development arrest could occur in wild populations of Japanese oyster. The percentage of mantle abnormalities remains in a same range of values ( $37.7 \% \pm 6.8$  vs  $33.9 \% \pm 10.3$ ). So abnormalities affecting the mantle remain predominant, but with increasing temperatures, lower salinities and higher concentrations of contaminant, developmental arrest could dramatically increase because embryos are subjected to anomaly of segmentation. The mantle ensures growth and development of the shell. So, these results demonstrate the importance of acting to reduce contamination linked to the aquatic environment. This study also highlights the potential impact of climate change and the need to slow down this phenomenon.

### **Conclusion**

The outcomes of the present study have revealed significant increase in oyster development defects when embryos were cultured in the current environmental conditions of the Arcachon Bay and even more when future environmental conditions were considered. The relatively high sensitivity of oyster embryos to combine environmental stress factors could explain why oyster farming in the Arcachon Bay has faced since 1998 several major crises. Moreover, the future scenario provides a better understanding of how climate change will impact oyster embryo-larval development with increasing percentage of developmental arrest. Finally, it highlighted the need of contamination reduction efforts in order to perpetuate oyster farming in the Arcachon Bay.

Chapitre 6 – Analyse de l’impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d’Arcachon sur le développement embryolaire de l’huître creuse Japonaise

### Acknowledgements

The authors thank the Aquitaine Region (OSQUAR Project), IRSTEA, Liens, Intermunicipal Union of Arcachon Bay (SIBA) and Water Agency Adour Garonne (AEAG) for their financial support. We gratefully acknowledge the staff of the SEPANSO for their help in obtaining reference seawater. This work was part of the LABEX COTE cluster of excellence "Continental To coastal Ecosystems: evolution, adaptability and governance". The authors would like to thank James Emery for providing English proofreading services.

### Reference

- AFNOR XP T 90-382, 209. Water quality - Bioindicator of potential toxicity in aqueous media - Determination of the potential toxicity of aqueous samples on bivalves embryo-larval development.
- ARCHYD, regional network. URL <http://www.ifremer.fr/surval2/#>
- Aaseth, J., Norseth, T., 1986. Handbook on the toxicology of metals 2, in: New York, NY : Elsevier Science Publishers. pp. 233–254.
- Adams, S.M., 2005. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems, in: Marine Pollution Bulletin. pp. 649–657. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.11.040
- 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 biomarkers for assessing the effects of pollutant stress on fish. Mar. Environ. Res. 28, 459–464.
- Adour-Garonne, A. de l’eau, 2013. Agence de l’eau Adour-Garonne - Journée technique « Qualité des eaux littorales : suivi et enjeux » Jeudi 20 juin 2013 – Espace culturel de Biganos (33) 1–5.
- Aerts, S., Haesbroeck, G., Ruwet, C., 2015. Multivariate coefficients of variation : Comparison and influence functions. J. Multivar. Anal. 142, 183–198. doi:10.1016/j.jmva.2015.08.006
- Agreste Primeur, 2014. Recensement de la conchyliculture 2012 160 000 tonnes de coquillages commercialisés 1–6.
- Akcha, F., Spagnol, C., Rouxel, J., 2012. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. Aquat. Toxicol. 106-107, 104–113. doi:10.1016/j.aquatox.2011.10.018
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquat. Toxicol. 76, 160–202. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015
- Auby, I., 1991. Contribution à l’étude des herbiers de *Zostera noltii* dans le Bassin d' Arcachon : dynamique, production et dégradation, macrofaune associée. Volume 1 357.
- Auby, I., Bocquene, G., Quiniou, F., Dreno, J.P., 2007. Etat de la contamination du Bassin d’Arcachon par les insecticides et les herbicides sur la période 2005-2006. Impact environnemental 24, 108.

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Japonaise

- Auby, I., Bost, C.-A., Budzinski, H., Dalloyau, S., Desternes, A., Belles, A., Trut, G., Plus, M., Pere, C., Couzi, L., Feigne, C., Steinmetz, J., 2011. Régression des herbiers de zostères dans le Bassin d'Arcachon : état des lieux et recherche des causes Régression des herbiers de zostères dans le Bassin d'Arcachon : état des lieux et recherche des causes. Ifremer ODE LER Arcachon 195.
- Auby, I., Maurer, D., 2004a. Etude de la reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon. Ifremer.
- Auby, I., Maurer, D., 2004b. Etude de la reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon Rapport final.
- Auby, I., Maurer, D., 2014. Rôle des communautés phytoplanctoniques sur la reproduction de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) dans le bassin d'Arcachon 48 p.
- Auby, I., Maurer, D., Connès, C., Barbier, C., Perrière-Rumèbe, M., Rigouin, L., Tournaire, M.-P., 2012. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon Année 2012. IFREMER 1–63.
- Auby, I., Maurer, D., Passoni, S., Heroin, D., Rigouin, L., Méteigner, C., Perrière-Rumèbe, M., Tournaire, M.-P., 2014. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon Année 2014. Ifremer 55.
- Auby, I., Oger-Jeanneret, H., Sauriau, P.-G., Hily, C., Barillé, L., 2010. Angiospermes des côtes françaises Manche-Atlantique. Propositions pour un indicateur DCE et premières estimations de la qualité. Annexe 2 : Fiches contenant les données sur les herbiers des différentes masses d'eau suivies dans le cadre de la DCE 152.
- Auffret, M., Oubella, R., 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. Comp. Biochem. Physiol. - A Physiol. 118, 705–712. doi:10.1016/S0300-9629(97)00017-0
- Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Le Floch, S., Renault, T., 2008. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Toxicol. Vitro. 22, 1610–1617. doi:10.1016/j.tiv.2008.04.011
- Baize, D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France), in: Institut National de La Recherche Agronomique INRA. p. 409.
- Barouki, R., 2006. Stress oxydant et vieillissement. Medecine/Sciences 22, 266–272. doi:10.1016/S0985-0562(02)00173-5
- Barros, P., Sobral, P., Range, P., Chicharo, L., Matias, D., 2013. Effects of sea-water acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas*. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 440, 200–206. doi:10.1016/j.jembe.2012.12.014
- Bebianno, M.J., Serafim, M. a., 1998. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. Sci. Total Environ. 214, 123–131. doi:10.1016/S0048-9697(98)00059-X
- Beiras, R., Albentosa, M., 2004. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals; implications for the implementation of seawater quality criteria. Aquaculture 230, 205–213. doi:10.1016/S0044-8486(03)00432-0
- Beiras, R., His, E., 1995. Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival and growth of *Mytilus galloprovincialis* mussel larvae. Mar. Ecol. Prog. Ser. 126, 185–189. doi:10.3354/meps126185
- Belin, C., Neaud-Masson, N., 2012. Cahier de Procédures REPHY 2012-2013 82.

Chapitre 6 – Analyse de l’impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d’Arcachon sur le développement embryonnaire de l’huître creuse Japonaise

- Ben Kheder, R., 2007. Étude sur le développement larvaire de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) en conditions contrôlées : recherche d’indices de qualité.
- Bernard, G., Bonhomme, P., Boudouresque, C.F., 2005. Recovery of the seagrass *Zostera marina* in a disturbed Mediterranean lagoon (Etang de Berre, Bouches-du-Rhône, Southern France). *Hydrobiologia* 539, 157–161. doi:10.1007/s10750-004-3080-7
- Bernard, I., 2011. Écologie de la reproduction de l’huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les côtes atlantiques françaises : Vers une explication de la variabilité du captage.
- Bessi, H., ElAlami, M., 2009. Les bio-essais dans l’évaluation d’impact des polluants sur les écosystèmes dulçaquicoles. *Les Technol. Lab.* n°15 16–22.
- Bijoux, H., 2014. Étude de l’impact des contaminants chimiques du Bassin d’Arcachon sur l’huître creuse *Crassostrea gigas* ; Approche in situ et expérimentale 387.
- Bird, A., 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396–398. doi:10.1038/nature05913
- Bisson, M., Houeix, N., Gay, G., Lacroix, G., Lefevre, J.P., Magaud, H., Tissot, S., Migne, V., Morin, A., 2005. Cuivre et ses dérivés. *INERIS* 1–66.
- Blanchet, H., 2004. Structure et Fonctionnement des peuplements benthiques du Bassin d’Arcachon 223.
- Bos, A.R., Bouma, T.J., de Kort, G.L.J., van Katwijk, M.M., 2007. Ecosystem engineering by annual intertidal seagrass beds: Sediment accretion and modification. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 74, 344–348. doi:10.1016/j.ecss.2007.04.006
- Bouchet, J.-M., Deltreil, J.-P., Manaud, F., Maurer, D., Triff, G., 1997. Etude intégrée du Bassin d’Arcachon. *IFREMER* Tome 5.
- Bouilly, K., Gagnaire, B., Bonnard, M., Thomasguyon, H., Renault, T., Miramand, P., Lapegue, S., 2006. Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 78, 149–156. doi:10.1016/j.aquatox.2006.02.028
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004a. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, 147–157. doi:10.1016/j.gene.2003.12.027
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004b. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *Gene, an Int. J. genes genomes* 272, 147–157. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04960.x
- Brenko, M.H., Calabrese, A., 1969. The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 4, 224–226.
- Brunel, S., Fraslin, C., Kuperminc, M., Perras, M., Prevost, J., 2013. Agriculture littorale du Bassin d’Arcachon - Projet « Littoral, Interface terre-mer ». *AgroParisTech* 1–35.
- Buck, K.N., Ross, J.R.M., Russell Flegal, a., Bruland, K.W., 2007. A review of total dissolved copper and its chemical speciation in San Francisco Bay, California. *Environ. Res.* 105, 5–19. doi:10.1016/j.envres.2006.07.006
- Budzinski, H., Tapie, N., Magnan, A., Benyahia, M., 2011. Rapport REPAR 1–23.
- Buestel, D., Ropert, D., Prou, J., Gouilletquer, P., 2009. History, status, and future of oyster culture in France. *J. Shellfish Res.* 28, 813–820.

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire larvaire de l'huître creuse Japonaise

- Buisson, S., Bouchart, V., Guerlet, E., Malas, J., Costil, K., 2008. Level of contamination and impact of pesticides in cupped oyster, *Crassostrea gigas*, reared in a shellfish production area in Normandy (France). *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 43, 655–664.
- Burnol, A., Duro, L., Grive, M., 2006. Eléments traces métalliques - Guide méthodologique - Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. INERIS 1–119. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Bustamante, P., Luna-Acosta, a., Clemens, S., Cassi, R., Thomas-Guyon, H., Warnau, M., 2012. Bioaccumulation and metabolisation of <sup>14</sup>C-pyrene by the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed via seawater. *Chemosphere* 87, 938–944. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.049
- Cairns, J., HEATH, A.G., PARKER, B.C., 1975. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia* 47, 135–171.
- Cajaraville, M., Bebianno, M., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295–311.
- Calabrese, A., 1969. Individual and combined effects of salinity and temperature on embryos and larvae of the coot clam, *Mulinia lateralis* (Say). *Mar. Biol. Lab.* 137, 417–428.
- Calabrese, A., Collier, S., Nelson, D. a., Macinnes, J.R., 1973. The Toxicity of Heavy Metals to Embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 66, 162–166. doi:10.1007/BF00367984
- Calvet, R., 1989. Adsorption of organic chemicals in soils. *Environ. Health Perspect.* 83, 145–177. doi:10.1289/ehp.8983145
- Campbell, Reece, 2004. La biotechnologie-Chapitre 20, in: *Biologie*, 2e Edition. p. 1364.
- Carbonell, G., Tarazona, J., 1994. Toxicokinetics of copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 29, 213–221.
- Carriger, J.F., Rand, G.M., 2008. Aquatic risk assessment of pesticides in surface waters in and adjacent to the Everglades and Biscayne National Parks: I. Hazard assessment and problem formulation. *Ecotoxicology* 17, 660–679. doi:10.1007/s10646-008-0230-0
- Castañón, C., Pascual, M., Camacho, A.P., 2009. Reproductive biology of the nonnative oyster, *Crassostrea gigas* (thunberg, 1793), as a key factor for its successful spread along the rocky shores of northern patagonia, argentina. *J. Shellfish Res.* 28, 837–847.
- Chapman, P.M., Long, E.R., 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 14, 81–84. doi:10.1016/0025-326X(83)90305-3
- Chen, M., Yang, H., Delaporte, M., Zhao, S., 2007. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge. *Aquaculture* 271, 479–487. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.051
- Cheng, T., Combes, C., 1990. Influence of environmental factors on the invasion of molluscs by parasites: with special reference to Europe, in: *Kluwer Academic Publishers*. pp. 307–332.
- Choi, Y.K., Jo, P.G., Choi, C.Y., 2008. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 147, 286–92. doi:10.1016/j.cbpc.2007.11.002
- Claissé, D., Alzieu, C., 1993. Copper contamination as a result of antifouling paint regulations? *Mar. Pollut. Bull.* 26, 395–397. doi:10.1016/0025-326X(93)90188-P

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire larvaire de l'huître creuse Japonaise

- Clark, G.M., Goolsby, D.A., Battaglin, W.A., 1999. Seasonal and annual load of herbicides from the Mississippi River basin to the Gulf of Mexico. *Environ. Sci. Technol.* 33, 981–986. doi:10.1021/es980962u
- Cochennec-laureau, N., 2015. Rapport d'activités 2014 Laboratoire Environnement Ressources du Morbihan-Pays de Loire.
- Cochennec-Laureau, N., Baud, J.P., 2011. Bilan des surmortalités des huîtres creuses *Crassostrea gigas* depuis 2008. *Bull. épidémiologique* 42, 2–5.
- Cognie, B., Haure, J., Barillé, L., 2006. Spatial distribution in a temperate coastal ecosystem of the wild stock of the farmed oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 259, 249–259. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.05.037
- Connor, P.M., 1972. Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 3, 190–192.
- Cook, M.E., Moore, P. a., 2008. The effects of the herbicide metolachlor on agonistic behavior in the crayfish, *Orconectes rusticus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 94–102. doi:10.1007/s00244-007-9088-z
- Coquillé, N., Jan, G., Moreira, A., Morin, S., 2015. Use of diatom motility features as endpoints of metolachlor toxicity. *Aquat. Toxicol.* 158, 202–210. doi:10.1016/j.aquatox.2014.11.021
- Cotter, E., Malham, S.K., O'Keefe, S., Lynch, S. a., Latchford, J.W., King, J.W., Beaumont, A.R., Culloty, S.C., 2010a. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of growth, biochemistry and gametogenesis. *Aquaculture* 303, 8–21. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.02.030
- Cotter, E., Malham, S.K., O'Keefe, S., Lynch, S.A., Latchford, J.W., King, J.W., Beaumont, A.R., Culloty, S.C., 2010b. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of growth, biochemistry and gametogenesis. *Aquaculture* 303, 8–21. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.02.030
- Cousins, R., 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* 65, 238–309.
- Crespo, A., 2009. Présence et sources des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le Bassin d'Arcachon 458.
- Cunningham, F.X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K. a, DellaPenna, D., Gantt, E., 1996. Functional analysis of the B and E lycopene cyclase enzymes of arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 8, 1613–1626.
- Czernichowski-Lauriol, I., Caudron, M., 1999. Pollution des eaux souterraines et superficielles par des produits phytosanitaires dans un même bassin hydrogéologique - Application dans le bassin de la Serre, département de l'Aisne. Rap. BRGM R 40615 71.
- Dagens, N., 2012. Réseau Pesticides Bassin d'Arcachon (REPAR) - Rapport d'étude - Les pratiques phytosanitaires agricoles et non agricoles sur le Bassin d'Arcachon 73.
- Dameron, C., Howe, P., 1998. Copper environmental health criteria n°200, World Health Organization. Geneva.
- Damiens, G., His, E., Quiniou, F., Roméo, M., 2004. Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comp. Biochem. Physiol. - Part C Toxicol. Pharmacol.* 138, 121–128.

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire larvaire de l'huître creuse Japonaise

- Damiens, G., Mouneyrac, C., Quiniou, F., His, E., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., 2006. Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*. Environ. Pollut. 140, 492–499. doi:10.1016/j.envpol.2005.08.006
- Davarpanah, E., Guilhermino, L., 2015. Single and combined effects of microplastics and copper on the population growth of the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. Estuar. Coast. Shelf Sci. 167, 269–275. doi:10.1016/j.ecss.2015.07.023
- Depledge, M., 1994. The rationale basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. Non destructive biomarkers in vertebrates, in: FOSSI, M.C., LEONZIO, C., Eds. Lewis Publishers. pp. 271–296.
- Deslous-Paoli, J., 1981. Toxicité des éléments métalliques dissous pour les larves d'organismes marins : données bibliographiques. Rev. des Trav. 'l Inst. des pêches Marit. 45, 73–83.
- Devi, M., Thomas, D., Barber, J., Fingerman, M., 1996. Accumulation and physiological and biochemical effects of Cadmium in a simple aquatic food chain. Ecotoxicol. Environ. Saf. 33, 38–43.
- Devier, M.-H., 2003. Etude intégrée sur l'impact des différentes classes de contaminants (composés organostanniques, métaux, HAP, PCB) sur les moules. Bioaccumulation et réponses biochimiques.
- Di Poi, C., Evariste, L., Serpentine, A., Halm-Lemeille, M.P., Lebel, J.M., Costil, K., 2013. Toxicity of five antidepressant drugs on embryo-larval development and metamorphosis success in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 21, 13302–13314. doi:10.1007/s11356-013-2211-y
- Doney, S.C., Ruckelshaus, M., Emmett Duffy, J., Barry, J.P., Chan, F., English, C. a, Galindo, H.M., Grebmeier, J.M., Hollowed, a B., Knowlton, N., Polovina, J., Rabalais, N.N., Sydeman, W.J., Talley, L.D., 2012. Climate change impacts on marine ecosystems. Ann. Rev. Mar. Sci. 4, 11–37. doi:10.1146/annurev-marine-041911-111611
- Doroudi, M., Southgate, P., Mayer, R., 1999. The combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.). Aquac. Res. 30, 271–277.
- Dorsey, A., Ingerman, L., Swarts, S., Corporation, S.R., 2004. Toxicological profile for copper. Agency Toxic Subst. Dis. Regist. Div. Toxicol. Inf. Branch 314.
- Dos Santos, A.E., Nascimento, I.A., 1985. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* guilding, 1828. Aquaculture 47, 335–352.
- Dos santos, A.E., Nascimento, I.A., 1985. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* guilding , 1828 47, 335–352.
- Du, Y., Zhang, L., Xu, F., Huang, B., Zhang, G., Li, L., 2013. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) development by quantitative real-time PCR. Fish Shellfish Immunol. 34, 939–945. doi:10.1016/j.fsi.2012.12.007
- Dubourg, B., 2012. Les huîtres triploïdes en plein débat. Sud Ouest.
- Echeverrigaray, Gomes, Tavares, 1999. Isolation and characterization of Ca<sup>2+</sup>-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 15, 679–681.



Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire larvaire de l'huître creuse Japonaise

- Eisenreich, S.J., JRC, I.I., C. Bernasconi, P. Campostrini, A. De Roo, G. George, A.-S., Heiskanen, J. Hjorth, N. Hoepffner K.C. Jones, P. Noges, N., Pirrone, N. Runnalls, F. Somma, N. Stilanakis, G. Umlauf, W., van de Bund, P. Viaroli, J. Vogt, J.-M.Z., 2005. Climate Change and the European Water Dimension 1–253.
- Ettajani, H., Amiard, J.C., 1995. Biodisponibilité de quelques métaux fixés sur les matières en suspension (MES) en milieu estuarien. *Hydroécologie Appliquée* 7, 75–89. doi:10.1051/hydro:1995005
- FAO, 2010. LA SITUATION MONDIALE DES PÊCHES ET DE L'AQUACULTURE - 2010. Département des pêches l'aquaculture la FAO. Organ. des nations Unies pour l'alimentation l'agriculture Rome, 241 p.
- Farcy, E., Fleury, C., Lelong, C., Dubos, M.P., Voiseux, C., Fiévet, B., Lebel, J.M., 2008. Molecular cloning of a new member of the p53 family from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and seasonal pattern of its transcriptional expression level. *Mar. Environ. ...* 66, 300–308. doi:10.1016/j.marenvres.2008.04.006
- Farcy, É., Voiseux, C., Lebel, J.M., Fiévet, B., 2009. Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress Chaperones* 14, 371–380. doi:10.1007/s12192-008-0091-8
- Fauvelle, V., N, M., F, D., K, M., M, E., H., B., 2012. Use of mixed-mode ion exchange sorbent for the passive sampling of organic acids by polar organic chemical integrative sampler (POCIS). *Environ. Sci. Technol.* 46, 13344–53. doi:10.1021/es3035279
- Fitzpatrick, J.L., Nadella, S., Bucking, C., Balshine, S., Wood, C.M., 2008. The relative sensitivity of sperm, eggs and embryos to copper in the blue mussel (*Mytilus trossulus*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 147, 441–9. doi:10.1016/j.cbpc.2008.01.012
- Flemming, C.A., Trevors, J.T., 1989a. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water. Air. Soil Pollut.* doi:10.1007/BF00228784
- Flemming, C.A., Trevors, J.T., 1989b. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water. Air. Soil Pollut.* 44, 143–158.
- Fujiya, M., 1970. Oyster farming in Japan. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 20, 464–479. doi:10.1007/BF01609922
- Gacia, E., Duarte, C.M., 2001. Sediment Retention by a Mediterranean *Posidonia oceanica* Meadow: The Balance between Deposition and Resuspension. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 52, 505–514. doi:DOI: 10.1006/ecss.2000.0753
- Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 536–547.
- Galay-Burgos, M., Spurgeon, D.J., Weeks, J.M., Stürzenbaum, S.R., Morgan, a J., Kille, P., 2003. Developing a new method for soil pollution monitoring using molecular genetic biomarkers. *Biomarkers* 8, 229–39. doi:10.1080/354750031000138685
- Galtsoff, P., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fish. Bull.* 64, 480.
- Gamain, P., Agnès Feurtet-Mazel Régine Maury-Brachet Isabelle Aubry, A.B.H.B., Daffe, G., Gonzalez, P., 2016a. Experimental ecotoxicological study of the impact of a cocktail of pesticides and copper on the seagrass *Zostera noltei* in the Arcachon bay. En préparation.

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryolaire de l'huître creuse Japonaise

- Gamain, P., Cachot, J., Gonzalez, P., Gourves, P.Y., Budzinski, H., Morin, B., 2016b. Do temporal and spatial parameters or lifestyle of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* broodstock native from the Arcachon Bay (Southwest coast of France) affect pollutant bioaccumulation, offspring development and tolerance to pollutants? En préparation.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Clérendean, C., Budzinski, H., Mazella, N., Martin, C., Gourves, P.Y., Morin, B., 2016c. Influence of the combined effects of temperature and pollutants on embryolarval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. En préparation.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Pardon, P., Tapie, N., Gourves, P.Y., Budzinski, H., Morin, B., 2016d. Combined effects of pollutants and salinity on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Mar. Environ. Res. 113, 31–38. doi:10.1016/j.marenvres.2015.11.002
- Ganthy, F., 2011. Rôle des herbiers de zostères (*Zostera noltii*) sur la dynamique sédimentaire du Bassin d'Arcachon 284.
- Gasch, a P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O., 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. Mol. Biol. Cell 11, 4241–4257. doi:10.1091/mbc.11.12.4241
- Geffard, O., 2001. Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : évaluation chimique et biologique, biodisponibilités des contaminants sédimentaires.
- Geffard, O., Budzinski, H., His, E., 2002. The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. Ecotoxicology 11, 403–416. doi:10.1023/A:1021024415695
- Geffard, O., Budzinski, H., LeMenach, K., 2004. " petroleum: Bio-tests applied to petroleum water-accommodated fractions and natural contaminated samples. Aquat. Living Resour. 17, 289–296. doi:10.1051/alr
- Geracitano, L. a., Luquet, C., Monserrat, J.M., Bianchini, a., 2004. Histological and morphological alterations induced by copper exposure in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). Mar. Environ. Res. 58, 263–267. doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.069
- Gerard, A., Boudry, P., Launav, S., Heurtebise, S., Phelipot, L.E.T.P., 1995. Contrôle de la Gamétogenese des huîtres creuses et plates . Relations " Reproduction " Et " Génétique ."
- Gervais, O., Renault, T., Arzul, I., 2015. Induction of apoptosis by UV in the flat oyster, *Ostrea edulis*. Fish Shellfish Immunol. 46, 232–242. doi:10.1016/j.fsi.2015.05.046
- Gieskes, J.M., Han, S., Rathburn, A., Rothwell, G., Pérez, M.E., Porrachia, M., Barbanti, A., Deheyn, D.D., 2015. Anthropogenic contaminants in Venice Lagoon sediments and their pore fluids: Results from the SIOSED Project. Mar. Chem. 174, 73–84. doi:10.1016/j.marchem.2015.05.008
- Gilliom, R.J., 2007. Pesticides in U.S. streams and groundwater. Environ. Sci. Technol. 41, 3408–3414. doi:10.1021/es072531u
- Goberville, E., Beaugrand, G., Sautour, B., Tréguer, P., 2010. Climate-driven changes in coastal marine systems of western Europe. Mar. Ecol. Prog. Ser. 408, 129–147. doi:10.3354/meps08564
- Gomiero, A., Viarengo, A., 2014. Effects of elevated temperature on the toxicity of copper and oxytetracycline in the marine model, *Euplotes crassus*: A climate change perspective. Environ. Pollut. 194, 262–271.

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire larvaire de l'huître creuse Japonaise

- Greenwood, P., 1981. Some effects of temperature-salinity combinations on the early development of the sea urchin *Parechinus angulosus* (Leske). Fertilization. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 51, 119–131.
- Groisman, P.Y., Karl, T.R., Easterling, D.R., Knight, R.W., Jamason, P.F., Hennessy, K.J., Suppiah, R., Page, C.M., Wibig, J., Fortuniak, K.V.N., Douglas, A., Førland, E., Zhai, P.-M., 1999. Change in the probability of heavy precipitation : important indicators of climatic change. Clim. Change 42, 243–283.
- Guimaraes, A., Linden, R., 2004. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. Eur. J. Biochem. 271, 1638–1650. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04084.x
- Gunkel, G., Streit, B., 1980. Mechanisms of bioaccumulation of herbicide (atrazine, s-triazine) in a freshwater mollusc (*Ancylus fluviatilis mull.*) and a fish (*Coregonus fera jurine*). Water Res. 14, 1573–1584.
- Hadfield, M.G., 2000. Why and how marine-invertebrate larvae metamorphose so fast. CELL Dev. Biol. 11, 437–443. doi:10.1006/scdb.2000.0197
- Hamdoun, A.M., Cheney, D.P., Cherr, G.N., 2003a. Phenotypic Plasticity of HSP70 and HSP70 Gene Expression in the Pacific Oyster ( *Crassostrea gigas* ): Implications for Thermal Limits and Induction of Thermal Tolerance. Biol. Bull. 205, 160–169.
- Hamdoun, A.M., Cheney, D.P., Cherr, G.N., Box, P.O., Bay, B., Ave, S., Toxicology, E., Davis, C., 2003b. Phenotypic Plasticity of HSP70 and HSP70 Gene Expression in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*): Implications for Thermal Limits and Induction of Thermal Tolerance 160 –169. doi:10.2307/1543236
- Hartmann, D.J., Klein Tank, A.M.G., Rusticucci, M., Alexander, L. V, Brönnimann, S., Charabi, Y.A.-R., Dentener, F.J., Dlugokencky, E.J., Easterling, D.R., Kaplan, A., Soden, B.J., Thorne, P.W., Wild, M., Zhai, P., 2013. Observations: Atmosphere and Surface. Clim. Chang. 2013 Phys. Sci. Basis. Contrib. Work. Gr. I to Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang. 159–254. doi:10.1017/CBO9781107415324.008
- Helm, M.M., Millican, P.F., 1977. Experiments in the hatchery rearing of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). Aquaculture 11, 1–12.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry : role of free radicals, Rhinology. Supplement. doi:10.1159/0003199858
- Heugens, E.H.W., Jager, T., Creyghton, R., Kraak, M.H.S., Hendriks, a. J., Van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2003. Temperature-dependent effects of cadmium on *daphnia magna*: Accumulation versus sensitivity. Environ. Sci. Technol. 37, 2145–2151. doi:10.1021/es0264347
- His, E., 1976. La detection des pontes dans le milieu naturel : application de l'ostréographie a l'etude de la reproduction des huîtres. Haliotis 5, 10.
- His, E., 1991. Biologie et écotoxicologie des véligères de *Crassostrea gigas* (Thunberg) dans le Bassin d'Arcachon.
- His, E., Beiras, R., Quiniou, F., Parr, A.C.S., Smith, M.J., Cowling, M.J., Hodgkiess, T., 1996. The non-toxic effects of a novel antifouling material on oyster culture. Water Res. 30, 2822–2825.
- His, E., Beiras, R., Silhouette, C., 1997. A Simplification the Bivalve Embryogenesis and Larval Development Bioassay Method for Water Quality Assessment. Water. Res 31, 351–355. doi:10.1016/S0043-1354(96)00244-8

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Japonaise

- His, E., Heyvang, I., Geffard, O., De Montaudouin, X., 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Res.* 33, 1706–1718. doi:10.1016/S0043-1354(98)00381-9
- His, E., Robert, R., 1982. Le danger des traitements par le sulfate de cuivre en zone conchylicole : toxicité vis-à-vis des oeufs et des jeunes larves de *Crassostrea gigas*. *Rev. des Trav. l'Institut des Pêches Marit.* 45, 117–125.
- His, E., Robert, R., Dinet, A., 1989a. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*.
- His, E., Robert, R., Dinet, A., 1989b. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 100, 455–463.
- His, E., Seaman, M., 1993. Effects of twelve pesticides on larvae of oysters (*Crassostrea gigas*) and on two species of unicellular marine algae (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*). *ICES Mar. Environ. Qual. Comm.* 8.
- Hodson, P., Borgmann, U., Shear, H., 1979. Copper in the environment: Part 2 Health Effects, in: J. O. Nriagu, Ed., John Wiley & Sons Ltd, Toronto. pp. 307–372.
- Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P.J., Hooten, A.J., Steneck, R.S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C.D., Sale, P.F., Edwards, A.J., Caldeira, K., Knowlton, N., Eakin, C.M., Iglesias-Prieto, R., Muthiga, N., Bradbury, R.H., Dubi, A., Hatziolo, M.E., 2007. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Sci. mag* 318, 1737–1742.
- Hollows, C., Johnston, E., Marshall, D., 2007. Copper reduces fertilization success and exacerbates Allee effects in the field. *Mar. Pollut. Bull.* 333, 51–60.
- Holmstrup, M., Bindsø, A.-M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.-R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Ferreira, A.L.G., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P.E., Bayley, M., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Sci. Total Environ.* 408, 3746–3762. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.10.067
- Horiguchi, T., Imai, T., Cho, H.S., Shiraishi, H., Shibata, Y., Morita, M., Shimizu, M., 1998. Acute toxicity of organotin compounds to the larvae of the rock shell, *Thais clavigera*, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the giant abalone, *Haliotis madaka*. *Mar. Environ. Res.* 46, 469–473. doi:10.1016/S0141-1136(97)00058-5
- Hrs-Brenko, M., 1981. The growth and survival of larvae of several bivalve species at high temperatures and the practicability of their culture in heated effluent waters. *Acta Biol. Iugosl. Ichthyol.* 13, 29–37.
- Hrs-Brenko, M., Calabrese, A., 1969. The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 4, 224–226.
- Hrs-Brenko, M., Claus, C., Bubic, S., 1977. Synergistic effects of lead, salinity and temperature on embryonic development of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biol.* 44, 109–115. doi:10.1007/BF00386951
- Hung, T.-C., Meng, P.-J., Han, B.-C., Chuang, A., Huang, C.-C., 2001. Trace metals in different species of mollusca, water and sediments from Taiwan coastal area. *Chemosphere* 44, 833–841.

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire larvaire de l'huître creuse Japonaise

- Ifremer, 2008. Impact potentiel des activités nautiques sur la qualité des eaux du Bassin d'Arcachon. IFREMER 35.
- Ifremer, 2009. Fiche d'information Ifremer - Les huîtres triploïdes - Fiche Aquaculture du 27 novembre 2009.
- Ifremer, 2014. Qualité du Milieu Marin Littoral - Bulletin de la surveillance - Edition 2014 131.
- IPCC, 2013. Working group I contribution to the IPCC fifth assessment report climate change 2013 : The physical science basis final draft underlying scientific-technical assessment.
- Jones, C.G., Lawron, J.H., Shachak, M., 1997. Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology* 78, 1946–1957. doi:10.1890/0012-9658(1997)078[1946:PAEEOO]2.0.CO;2
- Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M., 1994. Organisms as Ecosystem Engineers Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69, 373–386.
- Kinne, 1964. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. II. Salinity and temperature-salinity combinations. *Ocean. Mar. Biol. Annu. Rev.* 2, 281–339.
- Ko, G.W.K., Dineshram, R., Campanati, C., Vera, C.B.S., Havenhand, J., Thiyagarajan, V., 2014. Interactive Effects of Ocean Acidification, Elevated Temperature and Reduced Salinity on Early-Life Stages of the Pacific Oyster. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10079–10088. doi:10.1021/es501611u
- Kroeker, K.J., Kordas, R.L., Crim, R., Hendriks, I.E., Ramajo, L., Singh, G.S., Duarte, C.M., Gattuso, J.P., 2013. Impacts of ocean acidification on marine organisms: Quantifying sensitivities and interaction with warming. *Glob. Chang. Biol.* 19, 1884–1896. doi:10.1111/gcb.12179
- Kroeker, K.J., Kordas, R.L., Crim, R.N., Singh, G.G., 2010. Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecol. Lett.* 13( 11), 1419–1434.
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R., 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* (80-. ). 319, 1827–1830. doi:10.1126/science.1153069
- Kumar, a., Correll, R., Grocke, S., Bajet, C., 2010. Toxicity of selected pesticides to freshwater shrimp, *Paratya australiensis* (Decapoda: Atyidae): Use of time series acute toxicity data to predict chronic lethality. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 360–369. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.09.001
- Kurihara, H., Kato, S., Ishimatsu, A., 2007. Effects of increased seawater pCO<sub>2</sub> on early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Biol.* 1, 91–98. doi:10.3354/ab00009
- Lahman, S.E., Trent, K.R., Moore, P. a., 2015. Sublethal copper toxicity impairs chemical orientation in the crayfish, *Orconectes rusticus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 369–377. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.12.022
- Lannig, G., Flores, J.F., Sokolova, I.M., 2006. Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: Pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquat. Toxicol.* 79, 278–287.
- Lauenstein, G.G., 1995. Comparison of organic contaminants found in mussels and oysters from a current mussel watch project with those from archived mollusc samples of the 1970s. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 826–833. doi:10.1016/0025-326X(95)00089-6
- Le Berre, I., Hily, C., Lejart, M., Gouill, R., 2009. Analyse spatiale de la prolifération de *C. gigas* en Bretagne. *Cybergeo Eur. J. Geogr. Environnement, Nature, Paysage.* doi:10.4000/cybergeo.22818

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Japonaise

- Le Berre, S., Courtel, J., Brigand, L., 2010. Etude de la fréquentation nautique du Bassin d'Arcachon - Rapport final. Dir. régionale des Aff. Marit. Aquitaine – Serv. départemental Arcachon Géomer, Umr 6554 LETG – Univ. Bretagne Occident. 102.
- Legendre, Legendre, 1998. Numerical ecology. Transformation 1–4.
- Legoff, F., Bonnomet, V., 2004. Devenir et comportement des métaux dans l'eau : biodisponibilité et modèles BLM Rapport technique Devenir et comportement des métaux dans l'eau : biodisponibilité et modèles BLM Rapport technique. INERIS 87.
- Lehotay, S.J., Harman-fetcho, J.A., Mcconnell, L.L., 1998. Agricultural Pesticide Residues in Oysters and Water from Two Chesapeake Bay Tributaries 37, 32–44.
- Lejart, M., 2009. Etude du processus invasif de *Crassostrea gigas* en Bretagne: Etat des lieux, dynamique et conséquences écologiques.
- Leverett, D., Thain, J., 2013. Oyster embryo-larval bioassay ( revised ), in: ICES TECHNIQUES IN MARINE ENVIRONMENTAL SCIENCES. p. 38.
- Lewbart, G.A., 2011. No Title, in: Invertebrate Medicine, 2nd Edition. p. 504.
- Liang Liang, Z., Hun Kim, Y., Feng Zhang, Z., Min Lim, S., Ho Kang, K., 2009. Water temperature and salinity tolerance of embryos and spat of the mussel, *Musculista senhousia*. Korean J.Malacol. 25, 179–187.
- Lin, H., Hsu, S., Hwang, P.P., 2000. Maternal transfer of cadmium tolerance in larval *Oreochromis mossambicus*. J. Fish Biol. 57, 239–249.
- Lindquist, S., Craig, E.A., 1988. The heat-shock proteins.
- Littaye, A., Dantas, M., Hubert, R., 2011. Projet de parc naturel marin sur le bassin d'Arcachon et son ouvert. Agence des Aires Mar. protégées 152.
- Liu, H., Xiong, M., 2009. Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metolachlor to *Chlorella pyrenoidosa*. Aquat. Toxicol. 93, 100–106. doi:10.1016/j.aquatox.2009.04.006
- Liu, H., Ye, W., Zhan, X., Liu, W., 2006. A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 63, 451–455. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.02.002
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. Methods 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lough, R., Gonor, J., 1971. Early embryonic stages of *Adula californiensis* (Pelecypoda : Mytilidae) and the effect of temperature and salinity on developmental rate. Mar. Biol. 8, 118–125.
- Loureiro, S., Newton, A., Icely, J., 2006. Boundary conditions for the European Water Framework Directive in the Ria Formosa lagoon, Portugal (physico-chemical and phytoplankton quality elements). Estuar. Coast. Shelf Sci. 67, 382–398. doi:10.1016/j.ecss.2005.11.029
- Lucas, C.H., Horton, A.A., 2014. Short-term effects of the heavy metals, Silver and copper, on polyps of the common jellyfish, *Aurelia aurita*. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 461, 154–161. doi:10.1016/j.jembe.2014.08.003
- Luna-acosta, A., Renault, T., Thomas-guyon, H., Faury, N., Saulnier, D., Budzinski, H., 2012. Chemosphere Detection of early effects of a single herbicide ( diuron ) and a mix of herbicides and pharmaceuticals ( diuron , isoproturon , ibuprofen ) on immunological parameters of Pacific oyster ( *Crassostrea gigas* ) spat. Chemosphere 87, 1335–1340.

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Japonaise

doi:10.1016/j.chemosphere.2012.02.022

- Luo, L., Ke, C., Guo, X., Shi, B., Huang, M., 2014. Metal accumulation and differentially expressed proteins in gill of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) exposed to long-term heavy metal-contaminated estuary. *Fish Shellfish Immunol.* 38, 318–329. doi:10.1016/j.fsi.2014.03.029
- MacInnes, J.R., Calabrese, a., 1979. Combined effects of salinity, temperature, and copper on embryos and early larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 8, 553–562. doi:10.1007/BF01055036
- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H., Morin, B., 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2663–2670. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.10.009
- Mai, H., Gonzalez, P., Pardon, P., Tapie, N., Budzinski, H., Cachot, J., Morin, B., 2014. Comparative responses of sperm cells and embryos of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to exposure to metolachlor and its degradation products. *Aquat. Toxicol.* 147, 48–56. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.024
- Mai, H., Morin, B., Pardon, P., Gonzalez, P., Budzinski, H., Cachot, J., 2013. Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 89, 1–8. doi:10.1016/j.marenvres.2013.04.003
- Maniez, C., Laug, M., 2009. Captage du CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère, Ecole des Mines Douai.
- Manzo, S., Miglietta, M.L., Rametta, G., Buono, S., Di Francia, G., 2013. Embryotoxicity and spermotoxicity of nanosized ZnO for Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*. *J. Hazard. Mater.* 254-255, 1–7. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.03.027
- Mao, H., Wang, D.H., Yang, W.X., 2012a. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquat. Toxicol.* 110-111, 208–213. doi:10.1016/j.aquatox.2012.01.018
- Mao, H., Wang, D.-H., Yang, W.-X., 2012b. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquat. Toxicol.* 110-111, 208–213. doi:10.1016/j.aquatox.2012.01.018
- Marchand, M., Amouroux, I., Bédier, E., Belin, C., Claisse, D., Durand, G., Soudant, D., 2015. Qualité du Milieu Marin Littoral Synthèse Nationale de la Surveillance 2013- Edition 2015 1–60.
- Marie, V., Baudrimont, M., Boudou, A., 2006. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65, 609–617. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.01.074
- Marshall, D., 2008. Transgenerational plasticity in the sea: context-dependent maternal effects across the life history. *Ecology* 89, 418–427.
- Martin, M., Osborn, K.E., Billig, P., Glickstein, N., 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and Cancer magister larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 12, 305–308. doi:10.1016/0025-326X(81)90081-3
- Mason, R.P., 2013. Trace metals and organisms: Essential and toxic metals, organometallics, microbial processes, and metal bioaccumulation, in: *Trace Metals in Aquatic Systems*. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, UK. pp. 370–421. doi:10.1002/9781118274576
- Maurer, D., Auby, I., Moran, A., Barbier, C., Perrière-rumèbe, M., Tournaire, M.-P., Isabelle, A., Connes,

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Japonaise

- C., 2011. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon - Année 2011. Ifremer (LER AR). 61.
- Maurer, D., Auby, I., Passoni, S., Méteigner, C., Rigouin, L., Perrière-Rumèbe, M., Tournaire, M.-P., 2013. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon Année 2013. Ifremer 60.
- May, P., May, E., 1999. Rôles de P53 dans le cycle cellulaire, l'apoptose et le cancer. Rev. Française des Lab. 342, 41–48. doi:10.1016/S0338-9898(99)80035-3
- Meresse, M., Frostin, G., 2012. Quel avenir pour la filière ostréicole dans les régions de la façade atlantique française ? Cons. Econ. sociaux environnementaux l'Atlantique 54.
- Mermet-Bouvier, C., 2006. Caractérisation d'un nouveau récepteur à dépendance : TrkC et étude de la signification biologique de la fonction pro-apoptotique de RET dans la tumorigenèse.
- Mileikovsky, S. a., 1973. Speed of active movement of pelagic larvae of marine bottom invertebrates and their ability to regulate their vertical position. Mar. Biol. 23, 11–17. doi:10.1007/BF00394107
- Mille, D., Le Moine, O., 2011. Adaptabilités des activités conchylicoles aux modifications de leur environnement : Scénarii et solutions. La cas du bassin de Marennes-Oléron.
- Miossec, L., Deuff, R.-M. LE, Gouletquer, P., 2009. Alien species alert : *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). ICES Coop. Res. Rep. 46.
- Moal, J., Lambert, C., Moullac, G. Le, Moal, J., Lambert, C., Moullac, G. Le, 2010. Le facteur de risque température.
- Mori, K., 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Biol. 53, 361–369. doi:10.1007/BF00391619
- Mori, R., Wang, Q., Danenberg, K.D., Pinski, J.K., Danenberg, P. V., 2008. Both  $\beta$ -actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. Prostate 68, 1555–1560. doi:10.1002/pros.20815
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Dubreule, C., Serpentine, A., Lebel, J.M., Costil, K., 2014. Effects of acute exposures to mecoprop, mecoprop-p and their biodegradation product (2-MCP) on the larval stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquat. Toxicol. 146, 165–175. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.008
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpentine, A., Lebel, J.M., Jha, A.N., Costil, K., 2013. Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquat. Toxicol. 128-129, 67–78. doi:10.1016/j.aquatox.2012.12.002
- Mottin, E., Caplat, C., Latire, T., Mottier, A., Mahaut, M.L., Costil, K., Barillier, D., Lebel, J.M., Serpentine, A., 2012. Effect of zinc sacrificial anode degradation on the defence system of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Chronic and acute exposures. Mar. Pollut. Bull. 64, 1911–1920. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.06.017
- Muñoz, I., Rosés, N., 2000. Comparison of extraction methods for the determination of atrazine accumulation in freshwater molluscs (*Physa acuta* Drap. and *Ancylus fluviatilis* Müll, Gastropoda). Water Res. 34, 2846–2848. doi:10.1016/S0043-1354(99)00394-2
- Nadella, S.R., Fitzpatrick, J.L., Franklin, N., Bucking, C., Smith, S., Wood, C.M., 2009. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossolus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol. 149, 340–348. doi:10.1016/j.cbpc.2008.09.001



Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Japonaise

- Neves, M., Castro, B.B., Vidal, T., Vieira, R., Marques, J.C., Coutinho, J. a. P., Gonçalves, F., Gonçalves, a. M.M., 2015. Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecol. Indic.* 53, 220–230. doi:10.1016/j.ecolind.2015.01.031
- Newton, a., Icely, J.D., Falcao, M., Nobre, a., Nunes, J.P., Ferreira, J.G., Vale, C., 2003. Evaluation of eutrophication in the Ria Formosa coastal lagoon, Portugal. *Cont. Shelf Res.* 23, 1945–1961. doi:10.1016/j.csr.2003.06.008
- O'Connell, P.J., Harms, C.T., Allen, J.R.F., 1998. Metolachlor, S-metolachlor and their role within sustainable weed-management. *Crop Prot.* 17, 207–212. doi:10.1016/S0261-2194(98)80011-2
- O'Connor, W.A., Lawler, N.F., 2004a. Salinity and temperature tolerance of embryos and juveniles of the pearl oyster, *Pinctada imbricata Röding*. *Aquaculture* 229, 493–506. doi:10.1016/S0044-8486(03)00400-9
- O'Connor, W.A., Lawler, N.F., 2004b. Salinity and temperature tolerance of embryos and juveniles of the pearl oyster, *Pinctada imbricata Ro.* *Aquaculture* 229, 493–506. doi:10.1016/S0044-8486(03)00400-9
- Of, S., Thesis, T.H.E., 2013. THESIS.
- Okamura, H., Aoyama, I., Liu, D., Maguire, R., Pacepavicius, G., Lau, Y., 2000. Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. *Water Res.* 34, 3523–3530.
- Orth, R.J., Carruthers, T.I.M.J.B., Dennison, W.C., Duarte, C.M., James, W., Jr, K.L.H., Hughes, A.R., Kendrick, G.A., Kenworthy, W.J., Olyarnik, S., Short, F.T., Waycott, M., Williams, S.L., 2006. Global Crisis for Seagrass Ecosystems - Done. *Bioscience* 56, 987–996.
- Ozoh, P.T., 1992. The effect of temperature and salinity on copper body-burden and copper toxicity to *Hediste (Nereis) diversicolor*. *Environ. Monit. Assess.* 21, 11–17.
- Park, M.S., Jo, P.G., Choi, Y.K., An, K.W., Choi, C.Y., 2009. Characterization and mRNA expression of Mn-SOD and physiological responses to stresses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol. Res.* 5, 451–461. doi:10.1080/17451000802626554
- Parker, L.M., Ross, P.M., O'Connor, W. a., 2010. Comparing the effect of elevated pCO<sub>2</sub> and temperature on the fertilization and early development of two species of oysters. *Mar. Biol.* 157, 2435–2452. doi:10.1007/s00227-010-1508-3
- Peake, E., Locke, J., Tierney, L., Kolok, A., 2004. Copper tolerance in fatheadminnows: II. Maternal transfer. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 208–211.
- Perdue, J.A., Beattie, J.H., Chew, K.K., 1981. Some relationships between Gametogenic Cycle and Summer Mortality Phenomenon in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. *J. Shellfish Res.* 1, 9–16.
- Pernet, F., Barret, J., Le Gail, P., Malet, N., Pastoureaux, a, Munaron, D., De Lorget, J., Bachère, E., Vaquer, a, Huvet, a, Corporeau, C., Normand, J., Boudry, P., Moal, J., Quéré, C., Quilien, V., Daniel, J., Pépin, J., Saulnier, D., Gonzalez, J., Bouchouca, M., 2010. Mortalité du naissain d'huître creuse *Crassostrea gigas* dans l'étang de Thau en 2009 96.
- Pernet, F., Barret, J., Le Gall, P., Franck, L., Fiandrino, A., Huvet, A., Corporeau, C., Boudry, P., Quéré, C., Dégremont, L., 2011. Mortalités massives de l'huître creuse : causes et perspectives Rapport final du programme de recherche sur les mortalités d'huîtres creuses *Crassostrea gigas* dans l'

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Japonaise

étang de Thau.

- Pesando, D., Robert, S., Huitorel, P., Gutknecht, E., Pereira, L., Girard, J.P., Ciapa, B., 2004. Effects of methoxychlor, dieldrin and lindane on sea urchin fertilization and early development. *Aquat. Toxicol.* 66, 225–239. doi:10.1016/j.aquatox.2003.09.007
- Peyrefitte, M., 1993. La dynamique spatio-économique du Bassin d'Arcachon. IFREMER 1–10. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Piano, A., Asirelli, C., Caselli, F., Fabbri, E., 2002. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress Chaperones* 7, 250–257. doi:10.1379/1466-1268(2002)007<0250:HEITSO>2.0.CO;2
- Piquet, J.-C., 2014. DOCUMENT DE PRESCRIPTION « SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE » INVENTAIRE CARTOGRAPHIQUE DES POINTS DE PRELEVEMENT REMI ET DES LISTES DE ZONES CLASSEES ET SURVEILLEES 33.
- Plus, M., Dumas, F., Stanisière, J.-Y., Maurer, D., 2009. Hydrodynamic characterization of the Arcachon Bay, using model-derived descriptors. *Cont. Shelf Res.* 29, 1008–1013. doi:10.1016/j.csr.2008.12.016
- Plus, M., Maurer, D., Dumas, F., 2006. Caractérisation des composantes hydrodynamiques d'une lagune mésotidale, le Bassin d'Arcachon. PNEC – Chantier Littoral Atlantique : Mode de fonctionnement des systèmes semi-fermés du littoral Atlantique Thème 1 : Caractérisation des forçages hydrod. IFREMER 54.
- Pörtner, H.-O., Reipschlag, a, Heisler, N., 1998. Acid-base regulation, metabolism and energetics in *Sipunculus nudus* as a function of ambient carbon dioxide level. *J. Exp. Biol.* 201, 43–55.
- Pouvreau, S., Gangnery, A., Tiapari, J., Lagarde, F., Garnier, M., Bodoy, A., 2000. Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (*Bivalvia: Pteriidae*), cultivated in Takapoto atoll (French Polynesia). *Aquat. Living Resour.* 13, 37–48. doi:10.1016/S0990-7440(00)00135-2
- Pouvreau, S., Lepennec, M., 2006. Ecophysiologie de la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*.
- Przeslawski, R., Byrne, M., Mellin, C., 2015. A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. *Glob. Chang. Biol.* 21, 2122–2140. doi:10.1111/gcb.12833
- Quiniou, F., Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Geffard, a, Mouneyrac, C., Budzinski, H., Romeo, M., 2007. Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. *Env. Int* 33, 27–33. doi:S0160-4120(06)00097-3 [pii] 10.1016/j.envint.2006.06.020
- Quiniou, F., His, E., Delesmont, R., Caisey, X., 2005. Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux: bio-essai "développement embryonnaire de bivalve," Méthodes d'analyse en milieu marin.
- Quiniou, F., Toularastel, F., LeFevre-Lehoerff, G., 1991. Utilisation des bioessais sur les embryons de bivalves dans le cadre d'une surveillance des effets biologiques. IFREMER 22.
- Ramachandran, S., Patel, T.R., Colbo, M.H., 1997. Effect of copper and cadmium on three *Malaysian tropical* estuarine invertebrate larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 36, 183–188. doi:10.1006/eesa.1996.1508

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Japonaise

- Range, P., Pilo, D., Ben-Hamadou, R., Chicharo, M., Matias, D., Joaquim, S., Oliveira, A., Chicharo, L., 2012. Seawater acidification by CO<sub>2</sub> in a coastal lagoon environment: Effects on life history traits of juvenile mussels *Mytilus galloprovincialis*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 424, 89–98.
- Rice, C.P., Nochetto, C.B., Zara, P., 2002. Volatilization of Trifluralin, Atrazine, Metolachlor, Chlorpyrifos,  $\alpha$ -Endosulfan, and  $\beta$ -Endosulfan from Freshly Tilled Soil. J. Agric. Food Chem. 50, 4009–4017.
- Richardson, B.J., Mak, E., De Luca-Abbott, S.B., Martin, M., McClellan, K., Lam, P.K.S., 2008. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels “integrate” biomarker responses? Mar. Pollut. Bull. 57, 503–514. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.02.032
- Ringwood, A.H., 1992. Comparative sensitivity of gametes and early developmental stages of a sea urchin species (*Echinometra mathaei*) and a bivalve species (*Isognomon californicum*) during metal exposures. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 22, 288–295. doi:10.1007/BF00212088
- Ringwood, A.H., Brouwer, M., 1995. Patterns of metallothionein expression in oyster embryos. Mar. Environ. Res. 39, 101–105. doi:10.1016/0141-1136(94)00042-N
- Rivard, L., 2003. Environmental Fate of Metolachlor. Environ. Monit. Branch Dep. Pestic. Regul. 14.
- Robert, R., His, E., 1981. Action de 1,1-acétate de tributyle-étain sur les oeufs et les larves D de deux mollusques d'intérêt commercial : *Crassostrea gigas* (Thunberg) et *Hytilus galloprovincialis* (Lmk). Com. la Maric. 42, 1–16.
- ROCCH, 2015. Les contaminants chimiques dans les huîtres et les moules du littoral français URL <http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/parammaps/contaminants-chimiques/>
- Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals 22.
- Rollin, C., Quiot, F., 2006. Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines, Rapport INERIS-DRC. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Ruesink, J.L., Hunter, S.L., Trimble, A.C., Kimberly W. Heiman, Fiorenza Micheli, J.E.B., Kay, and M.C., 2005. INTRODUCTION OF NON-NATIVE OYSTERS: Ecosystem Effects and Restoration Implications.
- Ruttkey-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R., 2013. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. Int. J. Mol. Sci. 14, 6044–6066. doi:10.3390/ijms14036044
- Salvo, F., 2010. Approche comparée des populations naturelles et cultivées d'huître japonaise *Crassostrea gigas* dans une lagune macro-tidale (Bassin d'Arcachon) : cycle biologique, relations trophiques et effets sur le benthos 4, 510.
- Schroeder, H. a, Nason, a P., Tipton, I.H., Balassa, J.J., 1966. Essential trace metals in man: copper. J. Chronic Dis. 19, 1007–1034. doi:10.1016/0021-9681(70)90056-1
- Scourzic, T., Luyen, M., Fabre, E., Tessier, A., Dalias, N., Trut, G., Maurer, D., Simonnet, B., 2011. Evaluation du stock d'huîtres sauvages et en élevage dans le Bassin d'Arcachon.
- Shi, Y., 2002. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. Mol. Cell 9, 459–470. doi:10.1016/S1097-2765(02)00482-3
- Shine, J.P., Wallace, G.T., 1995. the Formation of Surface-Active Organic-Complexes of Copper in Coastal Marine Waters. Mar. Chem. 51, 145–157. doi:10.1016/0304-4203(95)00050-2

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Japonaise

- SIBA, 2013. Rapport annuel 2013 sur le prix et la qualité des services publics de l'assainissement collectif et non collectif 112.
- Song, Y.P., Suquet, M., Quéau, I., Lebrun, L., 2009. Setting of a procedure for experimental fertilisation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. *Aquaculture* 287, 311–314. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.018
- Srinivasan, M., Swain, G.W., 2007. Managing the Use of Copper-Based Antifouling Paints. *Environ. Manage.* 39, 423–441. doi:10.1007/s00267-005-0030-8
- Suquet, M., Amourda, C., Mingant, C., Quéau, I., Lebrun, L., Brizard, R., 2007. Setting of a procedure for experimental incubation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. *Aquaculture* 273, 503–508. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.018
- Suquet, M., Mercier, A. Le, Rimond, F., Mingant, C., Haffray, P., Labbe, C., Iroise, T.B., 2012. Setting tools for the early assessment of the quality of thawed Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) D-larvae. *Theriogenology* 78, 462–467.
- Tagu, D., Moussard, C., 2003. Principes des techniques de biologie moléculaire, in: *Principes Des Techniques de Biologie Moléculaire*. p. 176.
- Tettlebach, S.T., Rhodes, E.W., 1981. Combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the Northern Bay scallop *Argopecten irradians irradians*. *Mar. Biol.* 63, 249–256.
- Thakkar, M., Randhawa, V., Wei, L., 2013. Comparative responses of two species of marine phytoplankton to metolachlor exposure. *Aquat. Toxicol.* 126, 198–206. doi:10.1016/j.aquatox.2012.10.002
- Thiyagarajan, V., Ko, G.W.K., 2012. Larval growth response of the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*) to multiple climate change stressors. *Aquaculture* 370-371, 90–95. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.09.025
- Thomas-Guyon, H., Gagnaire, B., Bado-Nilles, A., Bouilly, K., Lapègue, S., Renault, T., 2009. Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Dev. Comp. Immunol.* 33, 653–659. doi:10.1016/j.dci.2008.11.011
- Trenkamp, S., Martin, W., Tietjen, K., 2004. Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty acid elongases from *Arabidopsis thaliana* by different herbicides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11903–11908. doi:10.1073/pnas.0404600101
- Turner, A., 2010. Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 159–171. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.12.004
- Untersee, S., Pechenik, J.A., 2007. Local adaptation and maternal effects in twospecies of marine gastropod (*Crepidula*) that differ in dispersal potential. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 347, 79–85.
- Van der Werf, H.M.G., 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agric. Ecosyst. Environ.* 60, 81–96.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, 1–12. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Ventura-Lima, J., Sandrini, J.Z., Cravo, M.F., Piedras, F.R., Moraes, T.B., Fattorini, D., Notti, A., Regoli, F., Geracitano, L. a., Marins, L.F.F., Monserrat, J.M., 2007. Toxicological responses in *Laonereis acuta* (annelida, polychaeta) after arsenic exposure. *Environ. Int.* 33, 559–564.

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire larvaire de l'huître creuse Japonaise

doi:10.1016/j.envint.2006.09.016

- Verkhovsky, M.I., Belevich, I., Bloch, D. a., Wikström, M., 2006. Elementary steps of proton translocation in the catalytic cycle of cytochrome oxidase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1757, 401–407. doi:10.1016/j.bbabi.2006.05.026
- Verween, a., Vincx, M., Degraer, S., 2007. The effect of temperature and salinity on the survival of *Mytilopsis leucophaeata* larvae (*Mollusca, Bivalvia*): The search for environmental limits. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 348, 111–120. doi:10.1016/j.jembe.2007.04.011
- Viarengo, A., Accomando, R., Ferrando, I., Beltrame, F., Fato, M., Marcenaro, G., 1996. Heavy metal effects on cytosolic free Ca<sup>2+</sup> level in the marine protozoan *Euplotes crassus* evaluated by confocal laser scanning microscopy. *Comp. Biochem. Physiol. C-Pharmacology Toxicol. Endocrinol.* 113, 161–168.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 146, 281–300. doi:10.1016/j.cbpc.2007.04.011
- Waddington, C., 1942. Canalisation of development and the inheritance of acquired characters. *Group* 563–565.
- Waeles, M., Riso, R.D., Cabon, J.Y., Maguer, J.F., L'&apos;Helguen, S., 2009. Speciation of dissolved copper and cadmium in the Loire estuary and over the North Biscay continental shelf in spring. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84, 139–146. doi:10.1016/j.ecss.2009.06.011
- Ward, L.G., Kemp, W.M., Boyton, W.R., 1984. The influence of waves and seagrass communities on suspended particulates in an estuarine embayment. *Mar. Geol.* 59, 85–103. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Warner, K., Frankel, E., 1987. Effects of  $\beta$ -Carotene on light stability of soybean oil 64, 213–218.
- Watermann, B.T., Herlyn, M., Daehne, B., Bergmann, S., Meemken, M., Kolodzey, H., 2008. Pathology and mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in 2005 at the East Frisian coast, Germany. *J. Fish Dis.* 31, 621–630. doi:10.1111/j.1365-2761.2008.00953.x
- Waycott, M., Duarte, C.M., Carruthers, T.J.B., Orth, R.J., Dennison, W.C., Olyarnik, S., Calladine, A., Fourqurean, J.W., Heck, K.L., Hughes, Ar., Kendrick, G.A., Kenworthy, Wj., Short, F.T., Williams, S.L., 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 12377–12381. doi:10.1073/pnas.0905620106
- Weisshaar, H., Böger, P., 1987. Primary effects of chloroacetamides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 28, 286–293. doi:10.1016/0048-3575(87)90027-7
- Weisshaar, H., Retzlaff, G., Ger, P.B., 1988. Chloroacetamide Inhibition of Fatty Acid Synthesis Chloroacetamides are an established preemergent herbicide class ; their mode of action , however , has still to be elucidated . Cell metabolism is generally disturbed , and the most pronounced effects are 216, 212–216.
- Weng, N., Wang, W., 2014a. Improved tolerance of metals in contaminated oyster larvae. *Aquat. Toxicol.* 146, 61–69. doi:10.1016/j.aquatox.2013.10.036
- Weng, N., Wang, W.X., 2014b. Improved tolerance of metals in contaminated oyster larvae. *Aquat. Toxicol.* 146, 61–69. doi:10.1016/j.aquatox.2013.10.036

Chapitre 6 – Analyse de l'impact de conditions présentes et futures de températures, salinité et de concentrations en contaminants dans les eaux du Bassin d'Arcachon sur le développement embryonnaire de l'huître creuse Japonaise

- Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., Akcha, F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[alpha]pyrene, 17 alpha-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.* 85, 133–142. doi:DOI 10.1016/j.aquatox.2007.08.007
- Wisely, B., Blick, R., 1967. Mortality of marine invertebrate larvae in mercury, copper, and zinc solutions. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 18, 63 – 72.
- Wolins, N.E., Brasaemle, D.L., Bickel, P.E., 2006. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett.* 580, 5484–5491. doi:10.1016/j.febslet.2006.08.040
- Wu, S., Lin, H., Yang, W., 2008. The effects of maternal Cd on the metallo-thionein expression in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae. *Aquat. Toxicol.* 87, 296–302.
- Xu, D., Wen, Y., Wang, K., 2010. Effect of chiral differences of metolachlor and its (S)-isomer on their toxicity to earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1925–1931. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.07.035
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54. doi:10.1038/nature11413
- Zhang, Z., Xiaoxu, L., Vandeppeer, M., Zhao, W., 2006. Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256, 502–509.

L'impact embryo-toxique via l'étude des malformations larvaires est un paramètre apportant des informations essentielles à la compréhension des effets des polluants et du changement climatique sur le développement des larves d'huîtres. Cependant, le comportement de ces larves peut évoluer en présence de ces différents facteurs. C'est pourquoi dans la suite de cette étude nous avons cherché à analyser le comportement natatoire des larves D en condition contrôle et lors de l'exposition au cuivre ou au S-métolachlore.

---

Chapitre 7 - ANALYSE COMPORTEMENTALE DES LARVES  
DE L'HUÎTRE CREUSE *CRASSOSTREA GIGAS* ISSUE DU  
BASSIN D'ARCACHON

---



## Chapitre 7. Analyse comportementale des larves de l’huître creuse *Crassostrea gigas* issue du Bassin d’Arcachon

Depuis l’avènement des sciences de la toxicologie, les paramètres comportementaux ont été utilisés pour étudier les effets des produits chimiques et des médicaments sur les humains et d’autres mammifères. En toxicologie aquatique, le lien entre sciences du comportement et impacts des substances toxiques a seulement pris de l’importance au cours des 5 dernières décennies. Le comportement peut être le résultat d’adaptations à des variables environnementales. Il représente donc une réponse sélective qui est adaptée en permanence par interaction directe avec les aspects physiologiques de l’environnement physique, chimique et social. Ainsi l’étude des paramètres comportementaux constituent des outils précieux pour discerner et évaluer les effets de l’exposition aux facteurs de stress environnementaux. Bien qu’étant le stade le plus précoce dans la vie de l’huître, les larves n’en restent pas moins des animaux, capables de se mouvoir et de réagir à leur environnement.

Six à huit heures après la fécondation, la larve trocophore apparaît. Dépourvue de coquille, elle est caractérisée par la présence de cils qui vont lui permettre de se déplacer dans son milieu par rotation. Jusqu’à présent, les recherches sur le déplacement des larves se sont concentrées sur les tous premiers stade de vie des bivalves marins (Mileikovsky, 1973) et sur les effets du pH ou de la salinité (Suquet et al., 2013) ou de différents polluants (Horiguchi et al., 1998) sur ces mouvements. Il n’est référencé qu’une seule étude récente sur les capacités de nage des larves D de *C. gigas* mais seul le pourcentage de mobilité a été analysé (Suquet et al., 2012). Aucune étude ne s’est encore intéressée à l’impact des polluants sur les capacités de nage des larves D. Le premier objectif de ce travail est de développer et d’optimiser un logiciel permettant l’analyse du comportement natatoire des larves D à partir d’enregistrements vidéo. Le deuxième objectif est d’étudier différents paramètres comportementaux des larves D en réponse à une exposition aux deux polluants modèles du Bassin d’Arcachon.

La première étape est de réaliser des acquisitions d’images à l’aide du microscope Nikon. Dans un deuxième temps le traitement des images a été mis au point. Le but est de pouvoir détecter les larves D et leur déplacement à partir de vidéos faites au microscope.

### 1. Acquisition des images

Pour mener à bien cette recherche, deux expériences ont été réalisées. La première s’est basée sur l’utilisation des huîtres d’écloserie de Guernesey exposées à différentes concentrations de Cu et S-métolachlore afin de tester et valider la méthode d’analyse du comportement des larves D. Les embryons d’huîtres ont été exposés à des concentrations de 1 et 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cuivre, et de 10 et 100  $\text{ng.L}^{-1}$  de S-métolachlore. Ces deux dernières concentrations ont été sélectionnées car elles représentent des concentrations environnementales basses et hautes des eaux du Bassin d’Arcachon. Au vu des résultats obtenus suite à la contamination des larves à 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cuivre, à savoir 100 % d’arrêt de développement, cette condition n’a pas été retenue dans le cadre de cette étude. Afin de s’assurer de l’absence d’un stress supplémentaire comme une trop grande variation de température au cours des vidéos, la température des puits est mesurée avant et à la fin de la prise des films (Annexe 4).

La deuxième expérience a été réalisée sur des embryons d’huîtres du bassin d’Arcachon. Pour cela les huîtres sauvages et cultivées prélevées au cours de la campagne d’été 2014 en deux points du Bassin ont été utilisées (Les Jacquets et Compran). Sur les embryons ayant été exposés à plusieurs concentrations en contaminants pour l’étude des malformations larvaires, des vidéos ont été réalisées pour chacune d’entre elles : 1 et 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de cuivre ; 10, 100 et 1000  $\text{ng.L}^{-1}$  de métolachlore. Les résultats obtenus lors des différentes campagnes ont été regroupés afin d’avoir un nombre suffisant de larves et de vidéos exploitables.

Au préalable, après stimulation des huîtres, environ 250 embryons obtenus après fécondation ont été introduits dans chacun des puits correspondant aux conditions d’étude. Le test embryo-larvaire a été réalisée en condition optimale de développement (24 °C pendant 24h, à la salinité de 33 u.s.i). 4 réplicats ont été réalisés par condition d’étude. Après réalisation du test embryo-larvaire et avant fixation au formol des larves D obtenues, des vidéos de 2 min ont été réalisées au grossissement x 100 à l’aide du microscope Nikon Eclipse et du logiciel d’acquisition NIS Élément D, en respectant les caractéristiques d’acquisition ci-dessous :

- Taux d’FPS : 100 fps (« Frames per second » correspondant au taux de rafraîchissement de l’écran, il représente l’équivalent du nombre d’images par seconde)
- Type de fichier : MJPEG compressé qui assure une qualité d’image suffisante pour l’étude de la trajectométrie et réduira aussi la taille du fichier de sortie
- Taille du fichier : Original

## 2. Traitement d’images

Il a été décidé d’utiliser le logiciel ImageJ, un logiciel de traitement d’images d’accès libre écrit en Java par le National Institute of Health (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>). Pour cela, une macro spécifique à notre étude a été développée en collaboration avec Alicia Romero Ramirez (Laboratoire EPOC, équipe ECOBIOC). Pour rendre compatible les films acquis avec le logiciel ImageJ, un prétraitement a été effectué. Les films ont été sous-échantillonnés (4 fps) et le format du fichier a été changé (AVI). Cela a été effectué avec le logiciel de libre accès Virtual Dub (<http://www.virtualdub.org/>).

Dans la macro développée, les films sont séparés en séquences d’images. Chaque image est rendue binaire en appliquant un « seuillage » automatique sur la base de l’entropie de leur histogramme. Une fois que les images sont binarisées, une détection de larves est lancée. Cette recherche va sélectionner les objets étant plus grands que 400 pixels et plus petits que 1000 pixels. Chaque objet trouvé peut faire partie de : (1) une nouvelle trajectoire (une nouvelle larve qui rentre dans notre champ d’image) ou (2) appartenir à une trajectoire précédemment initiée. Dans le deuxième cas, l’objet trouvé doit avoir la même taille (à 50 pixels près) et être situé à moins de 100 pixels (dans n’importe quelle direction) du dernier objet appartenant à la trajectoire sélectionnée. La macro mise en place permet aussi de : 1) dessiner les trajectoires sur une image pour faciliter leur visualisation et (2) exporter sur un fichier texte (\*.txt) différents paramètres pour post-traitement. Ces paramètres sont :

- Vitesse de nage maximale
- Distance parcourue
- Temps de nage
- Aire de l’individu considéré
- Périmètre de l’individu considéré
- Visualisation des trajectoires empruntées par chaque individu

Au cours de cette étude, seuls les paramètres vitesse moyenne, vitesse maximale, et les trajectoires des larves ont été exploités. Le grossissement auquel ont été réalisées les vidéos ne permet pas de visualiser l’ensemble du micropuits, c’est pourquoi, pour déterminer la vitesse moyenne, le calcul suivant a été appliqué :

$$\text{Vitesse moyenne} = \frac{\text{Distance parcourue par un individu}}{\text{Temps d'observation de l'individu}}$$

Les trajectoires n’étant pas données par le logiciel, elles sont appréciées par l’expérimentateur sur chaque vidéo étudiée une à une. Trois catégories de trajectoires ont ainsi été déterminées (Figure 50) :

- Surplace : les larves tournent sur elles-mêmes, ne se déplacent pas mais agitent leurs cils
- Trajectoires circulaires : les larves effectuent un tour complet sur elles-mêmes
- Trajectoires rectilignes : les larves effectuent un déplacement latitudinal

Ces analyses ont été réalisées par Clémence Compan dans le cadre d’un stage complémentaire de Master 2.

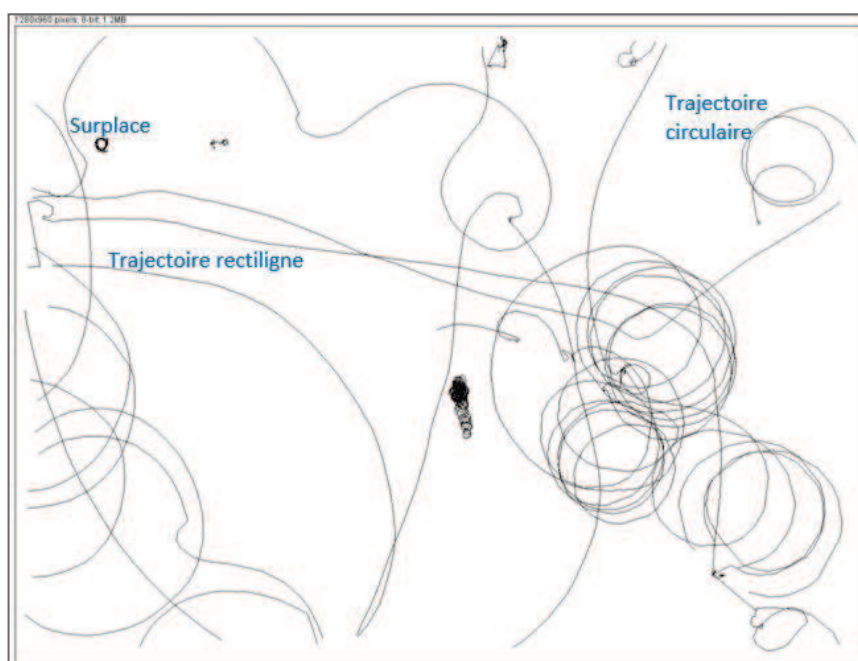


Figure 50 : Observation des différentes trajectoires possibles effectuées par les larves (Logiciel ImageJ)

### 3. Traitement statistiques

L'ensemble des données ont été traitées statistiquement à l'aide du logiciel R. Une vidéo est considérée comme exploitable uniquement si un minimum de 10 individus a pu être détecté. Pour les paramètres vitesse moyenne et vitesse maximal, les analyses statistiques ont été réalisées sur l'ensemble des individus détectés dans les 4 répliques analytiques. Au contraire pour les trajectoires, les statistiques ont été réalisées par vidéo. Les données sont représentées par des moyennes  $\pm$  erreurs standards. La normalité de la distribution des données a été vérifiée sur les résidus des données de façon graphique. L'homogénéité des variances a ensuite été évaluée par le test de Levène ( $p < 0,05$ ). Dans le cas de variances homogènes et de normalité des données, une analyse Anova a été effectuée sur les données suivie d'un test post-hoc de Tukey. Dans le cas contraire, les données ont été analysées par le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (<http://cran.r-project.org/>).

## 4. Résultats

### 4.1. Température dans les micropuits

Une variation d'un maximum de 1 °C est constatée pour chacune des conditions étudiées (Annexe 4), la température moyenne des puits étant de 21,2 °C  $\pm$  0,8 au moment de débiter le film et à 20,9 °C  $\pm$  0,6 en fin de film.

### 4.2. Dosage des polluants dans les eaux

Les tableaux 16 et 17 montrent les concentrations en cuivre et en S-métolachlore mesurées dans l'eau de mer de référence et les différentes solutions de contamination pour les huîtres d'écloserie et les huîtres d'Arcachon. Les analyses ont révélé la présence de cuivre dans l'eau de mer de référence à des concentrations  $< 2 \mu\text{g.L}^{-1}$  en 2014 et  $< 3,2 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour les huîtres d'écloserie. À la concentration nominale de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ , des concentrations trois fois plus élevées ont été obtenues pour les huîtres d'Arcachon ou d'écloserie ( $3,3 \mu\text{g.L}^{-1} \pm 0,7$  vs  $3,84 \mu\text{g.L}^{-1}$  respectivement). A  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , la concentration désirée a été obtenue avec une plage de variation de l'ordre de 10 % pour les deux conditions de l'étude. Les analyses ont révélé la présence de métolachlore dans l'eau de mer de référence à des concentrations  $< 6 \text{ng.L}^{-1}$ . A la concentration nominale de  $10 \text{ng.L}^{-1}$ , des concentrations presque deux fois plus élevées et 2,5 fois plus élevées ont été obtenues pour les huîtres d'Arcachon ou d'écloserie respectivement. A  $100 \text{ng.L}^{-1}$ , les concentrations ont été atteintes pour les huîtres d'Arcachon avec une plage de variation

de l’ordre de 8,1 %. Au contraire pour les huîtres d’écloserie des concentrations deux fois moins importantes ont été observées. A 1000 ng.L<sup>-1</sup>, les concentrations ont été atteintes avec une plage de variation de l’ordre de 8,4 %.

Tableau 17 : Concentrations nominales et mesurées en cuivre dans l’eau de mer de référence et les différentes solutions de contamination au début du test embryo larvaire sur les huîtres d’écloserie

	<b>Concentrations nominales</b>	<b>Control</b>	<b>1</b>	<b>10</b>
<b>Concentrations mesurées</b>	Arcachon	1,8	3,3	11,0
	Ecloserie	3,16	3,84	11,8

Tableau 18 : Concentrations nominales et mesurées en S-métolachlore dans l’eau de mer de référence et les différentes solutions de contamination au début du test embryo larvaire sur les huîtres d’écloserie ( / : concentration non utilisée pour cette expérience)

	<b>Concentrations nominales</b>	<b>Control</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>1000</b>
<b>Concentrations mesurées</b>	Arcachon	4,6	18	108,1	916
	Ecloserie	5,76	24,75	56,98	/

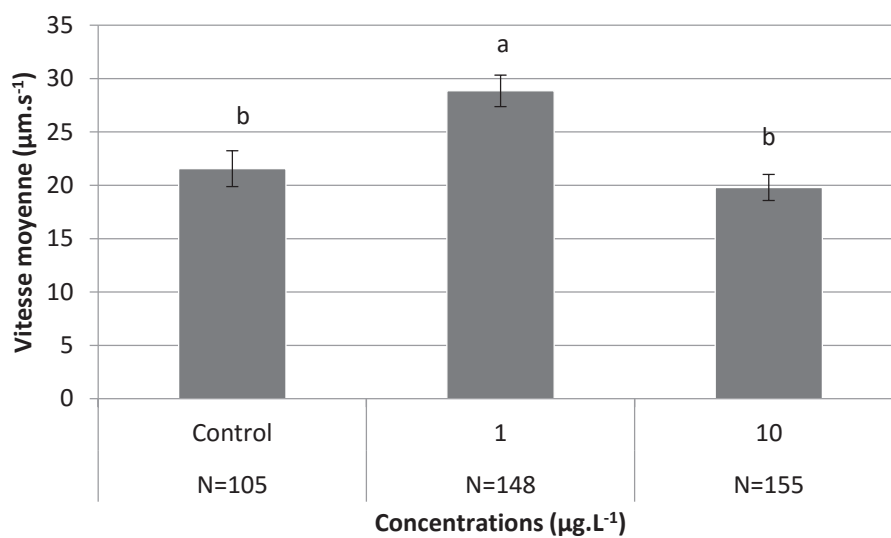
### 4.3. Etude comportementale des larves D

#### 4.3.1. Larves D issues des huîtres d’écloserie

En présence de cuivre, une augmentation significative de la vitesse moyenne et maximale des larves est observée à la concentration de 1 µg.L<sup>-1</sup> par rapport à la condition contrôle (Figure 51 et 52). En présence de S-métolachlore, aucune différence significative n’est observée pour ces deux paramètres quelle que soit la concentration testée (Figure 51 et 52).

En condition contrôle, les larves effectuent majoritairement des trajectoires rectiligne (70 %). En présence de cuivre, le pourcentage de trajectoire circulaire augmente significativement à la plus forte concentration de 10 µg.L<sup>-1</sup>. En présence de métolachlore, une augmentation significative du pourcentage de trajectoire circulaire à la concentration de 100 ng.L<sup>-1</sup> est notée (Figure 53).

A



B

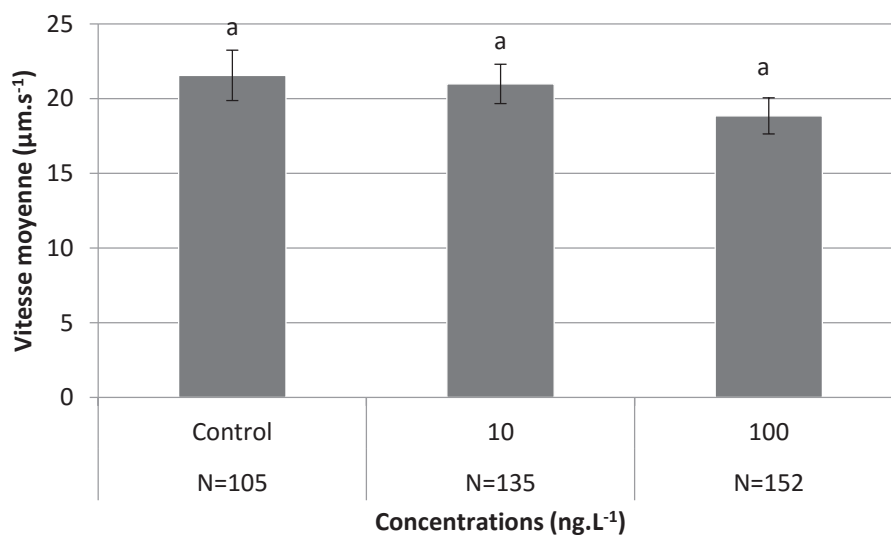


Figure 51 : Vitesses moyennes (Moyenne  $\pm$  Erreur Standard) ( $\mu\text{m.s}^{-1}$ ) observées sur les larves D issues des huîtres d'écloserie, exposées à différentes concentrations en cuivre (A) ou en métolachlore (B). N = Nombres de larves étudiées

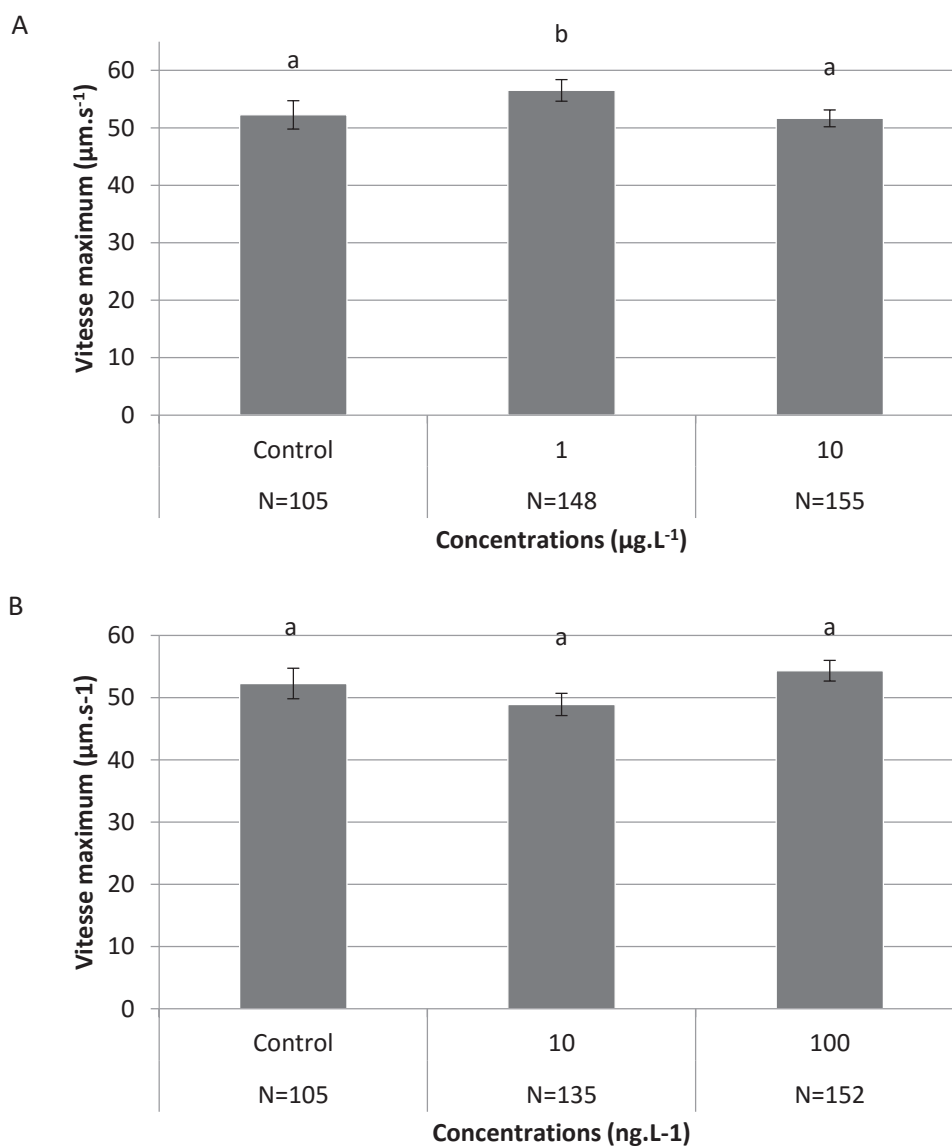


Figure 52 : Vitesses maximales (Moyenne  $\pm$  Erreur Standard) ( $\mu\text{m.s}^{-1}$ ) observées sur les larves D issues des huîtres d'écloserie, exposées à différentes concentrations en cuivre (A) ou en métolachlore (B). N = Nombres de larves étudiées



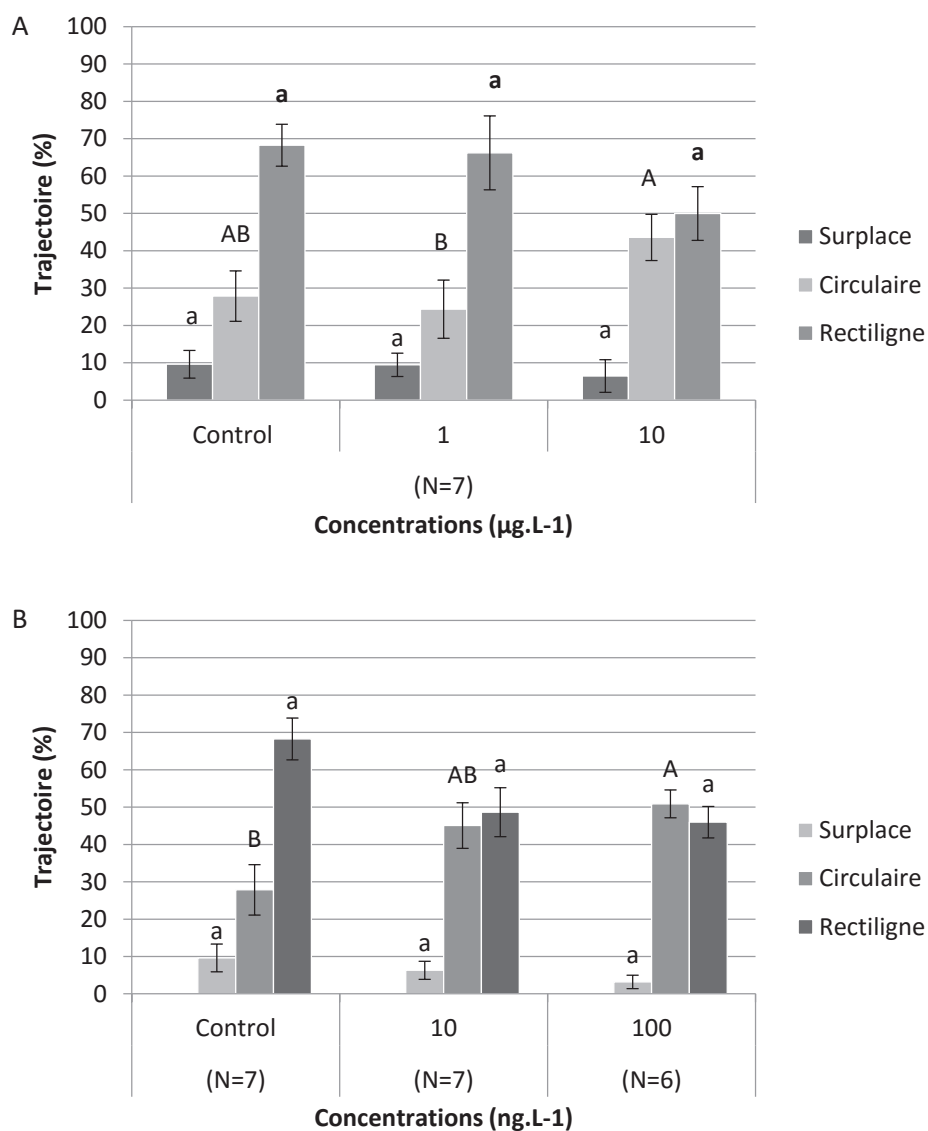


Figure 53 : Pourcentage des trajectoires observées (Surplace, circulaire, rectiligne)(Moyenne  $\pm$  Erreur standard) sur les larves D issues d'huîtres d'écloserie, exposées à différentes concentrations en cuivre (A) : 1 ou 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  ; ou en métolachlore (B) : 10 ou 100  $\text{ng.L}^{-1}$ . N : nombre de vidéos exploitées

#### 4.3.2. Huîtres du Bassin d'Arcachon

Malgré une diminution de la vitesse moyenne de nage des larves, aucune différence significative n'est observée quelle que soit la concentration en cuivre. En présence de S-métolachlore, la vitesse moyenne diminue significativement à la concentration de 100 ng.L<sup>-1</sup> (Figure 54).

Au contraire, la vitesse maximale atteinte par les larves en présence de cuivre diminue de manière significative à 1 µg.L<sup>-1</sup> mais n'apparaît pas significativement différente du contrôle à 10 µg.L<sup>-1</sup>. En présence de métolachlore, la vitesse maximale diminue significativement dès la concentration environnementale de 10 ng.L<sup>-1</sup>, puis un plateau est observé entre les différentes concentrations testées (Figure 55).

Les tests statistiques sur les différentes trajectoires des larves n'ont pas pu être réalisés pour la contamination au cuivre à cause d'un nombre de résultats insuffisants. Il est tout de même possible de voir une tendance à l'augmentation des trajectoires circulaires avec l'augmentation des concentrations en cuivre, et inversement une diminution des trajectoires rectilignes. En présence de S-métolachlore, le pourcentage de trajectoire circulaire a tendance à augmenter mais de manière non significative avec l'augmentation des concentrations en S-métolachlore. Le pourcentage de trajectoire rectiligne diminue significativement à 100 ng.L<sup>-1</sup> (Figure 56).

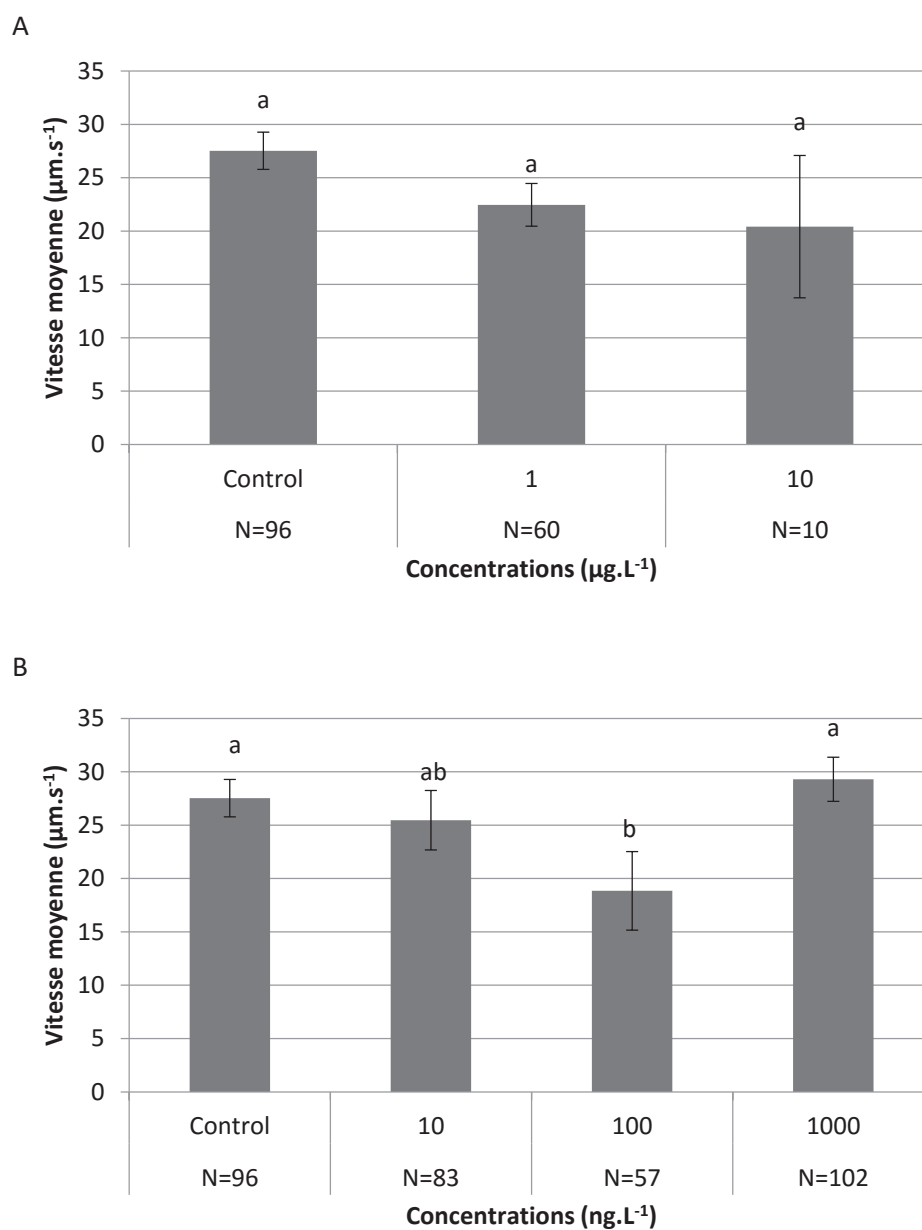


Figure 54 : Vitesses moyennes (Moyenne  $\pm$  Erreur Standard) ( $\mu\text{m.s}^{-1}$ ) des larves D issues des huîtres sauvages et cultivées du Bassin, exposées à différentes concentrations en cuivre (A) ou en métolachlore (B). N = Nombres de larves étudiées

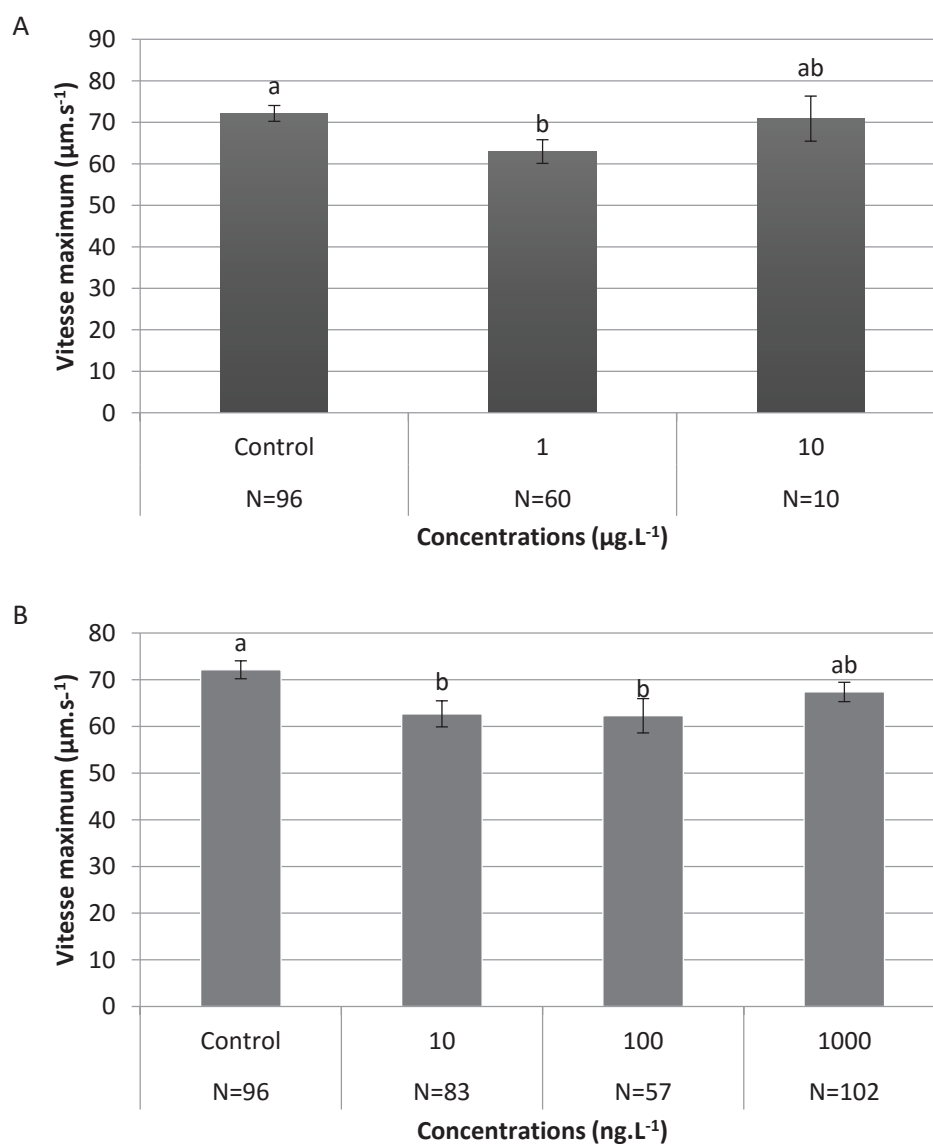


Figure 55 : Vitesses maximales (Moyenne  $\pm$  Erreur Standard) ( $\mu\text{m.s}^{-1}$ ) des larves D issues des huîtres sauvages et cultivées du Bassin, exposées à différentes concentrations en cuivre (A) ou en métolachlore (B). N = Nombres de larves étudiées

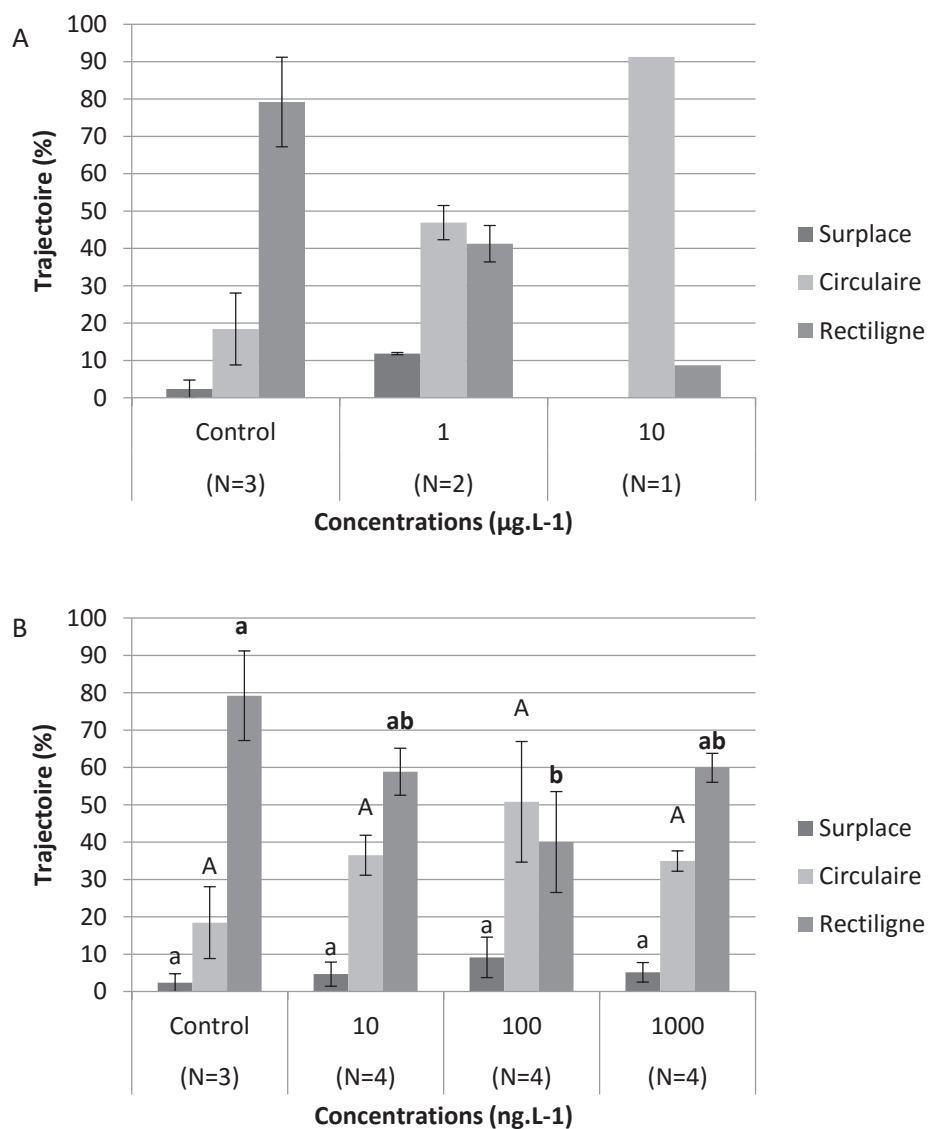


Figure 56 : Pourcentage des trois catégories de trajectoires (Surplace, circulaire, rectiligne) (Moyenne  $\pm$  Erreur standard) suivies par les larves *D* issues des huîtres sauvages et cultivées, exposées à différentes concentrations en cuivre (A) : 1 ou 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  ; ou en métolachlore (B) : 10 ou 100  $\text{ng.L}^{-1}$ . N : nombre de vidéos exploitées.

#### 4.4. Comparaison du comportement natatoire des larves issues des huîtres d’écloserie et d’Arcachon

Aucune différence significative de comportements natatoires entre les larves issues des huîtres d’écloserie ou du Bassin d’Arcachon n’a été observée quelle que soit la condition d’étude. Cependant, des différences significatives en absence de contamination sont observées pour les deux paramètres mesurés vitesse moyenne et vitesse maximale avec des valeurs significativement plus faibles pour les huîtres d’écloserie. En présence de cuivre, les résultats obtenus apparaissent significativement différents pour la vitesse moyenne à  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ , et pour la vitesse maximale à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ . En présence de métolachlore, les résultats apparaissent significativement différents pour la vitesse maximale à 10 et  $100 \text{ ng.L}^{-1}$  de métolachlore.

Tableau 19 : Comparaison des vitesses maximales ( $V_{\text{max}}$ ), vitesses moyennes ( $V_{\text{moy}}$ ) et des trajectoires (Surplace, Circulaire, Rectiligne) pour les larves issues des huîtres d’écloserie ou du Bassin d’Arcachon.

	$V_{\text{max}}$	$V_{\text{moy}}$	Surplace	Circulaire	Rectiligne
<i>Contrôle</i>	<b>p-value : 5,727E-10</b>	<b>p-value : 0,01</b>	p-value : 0,29	p-value : 0,21	p-value : 0,21
<i>Cuivre <math>1 \mu\text{g.L}^{-1}</math></i>	p-value : 0,07	<b>p-value : 0,01</b>	p-value : 0,7688	p-value : 0,24	p-value : 0,24
<i>Cuivre <math>10 \mu\text{g.L}^{-1}</math></i>	<b>p-value : 0,001</b>	p-value : 0,89			
<i>Métolachlore <math>10 \text{ ng.L}^{-1}</math></i>	<b>p-value : 1,952E-5</b>	p-value : 0,05	p-value : 0,46	p-value : 0,3	p-value : 0,23
<i>Métolachlore <math>100 \text{ ng.L}^{-1}</math></i>	<b>p-value : 0,03</b>	p-value : 0,99	p-value : 0,29	p-value : 0,21	p-value : 0,21

## 5. Discussion

La mesure des concentrations dans l’eau de mer de référence a mis en évidence une plus grande concentration en cuivre pour les expériences réalisées sur les huîtres d’écloserie. Aux concentrations théoriques de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ , des concentrations environ trois fois supérieures ont été obtenues. Finalement au vu des concentrations en cuivre présentes dans les eaux du Bassin d’Arcachon en période de reproduction (Gamain et al., 2016a), ces concentrations restent représentative de la contamination du milieu.

Des concentrations en métolachlore équivalente ont été mesurées dans l’eau de mer de référence utilisées pour les huîtres d’écloserie et les huîtres d’Arcachon. A la concentration théorique de  $10 \text{ ng.L}^{-1}$ , des concentrations deux fois et 2,5 fois supérieures ont été obtenues respectivement pour les huîtres d’Arcachon ou d’écloserie. Cependant ces concentrations restent représentative de la contamination

du milieu en période de reproduction (Archyd, 2015 ; Gamain et al., 2016). A la concentration théorique de  $100 \text{ ng.L}^{-1}$ , des concentrations deux fois moins importantes ont été obtenues pour les expériences menées sur les huîtres d’écloserie. Cependant cette concentration théorique représentant des concentrations environnementales hautes de ce qui est retrouvé dans les eaux du Bassin, cette valeur reste représentative de ces concentrations. Le plugin utilisé dans cette étude ainsi que la macro développée pour le logiciel ImageJ représentent des outils opérationnels pour évaluer les paramètres natatoires des larves D de l’huître creuse. Afin de déterminer les caractéristiques natatoires en conditions contrôlées de laboratoire, les huîtres d’écloserie, représentant un excellent proxy aux huîtres du milieu et notamment du bassin d’Arcachon (Gamain et al., 2016a), ont été utilisées. En conditions optimales de développement ( $T^\circ$  de  $24 \text{ }^\circ\text{C}$ , salinité de 33 u.s.i), les larves issues des huîtres d’écloserie effectuent majoritairement des trajectoires rectilignes ( $68 \% \pm 6$ ) avec une vitesse moyenne de  $21,6 \text{ } \mu\text{m.s}^{-1} \pm 1,7$  et une vitesse maximale moyenne de  $52,3 \text{ } \mu\text{m.s}^{-1} \pm 2,4$ . Ces résultats sont pour une part comparable avec ceux obtenus pour les larves issues des huîtres d’Arcachon, puisque ces larves effectuent aussi majoritairement des trajectoires rectilignes ( $79 \% \pm 11,9$ ). Cependant, les larves d’Arcachon nagent significativement plus vite avec une vitesse moyenne de  $27,5 \text{ } \mu\text{m.s}^{-1}$  et ont la capacité d’atteindre des vitesses maximales significativement plus importantes ( $72,1 \text{ } \mu\text{m.s}^{-1} \pm 1,9$ ). Ainsi le comportement « normal » des larves correspondrait à une nage rectiligne. Ces résultats confirment les premiers travaux menés par His et collaborateurs en 1989 sur la moule *Mytilus galloprovincialis* qui avaient évoqué qu’une nage circulaire ou en spirale dénotait un comportement erratique des larves. Lors d’une étude antérieure, l’analyse des vitesses moyennes de nage des larves D de *Crassostrea gigas* en absence de contamination a montré des vitesses d’environ  $100 \text{ } \mu\text{m.s}^{-1}$  (Suquet et al., 2012), ce qui est nettement supérieur aux vitesses observées dans notre étude. Cependant les embryons avaient été exposés à des températures de développement de  $19 \text{ }^\circ\text{C}$ , ce qui ne correspond pas à la température idéale de développement (AFNOR, 2009 ; Gamain et al., 2016b). En effet, nous avons montré (Gamain et al., 2016b) que de faibles températures au cours du développement donnent lieu à des taux importants de malformations, ce qui aura des conséquences sur le comportement et la vitesse de nage. De plus, toutes les larves ayant une vitesse inférieure à  $30 \text{ } \mu\text{m.s}^{-1}$  n’ont pas été comptabilisées.

Suite à une contamination au cuivre, les larves d’écloserie augmentent significativement leurs vitesses maximale et moyenne de nage pour une exposition à des concentrations environnementales. Puis pour des concentrations supérieures, les deux paramètres diminuent à nouveau pour revenir à des valeurs équivalentes à celles retrouvées en conditions contrôles. Pour les larves issues d’Arcachon, ce phénomène n’est pas observé. En effet, aucune différence significative des vitesses moyennes n’apparaît quelle que soit la concentration en cuivre considérée. Au contraire, à la concentration

environnementale, une diminution de la vitesse maximale est observée pour retrouver une valeur normale à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Les larves d'éclosion étant élevées en conditions contrôlées, sont moins soumises aux variations en contaminants tels que le cuivre et le métolachlore que les huîtres du Bassin d'Arcachon. Ceci pourrait expliquer l'absence d'effet sur la vitesse moyenne de nage pour les larves issues des huîtres du Bassin. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'aucune différence significative n'apparaît entre les différentes trajectoires effectuées par les larves quelle que soit la concentration en cuivre testée. Il faut noter cependant une tendance à l'augmentation des trajectoires circulaires. Au contraire pour les larves issues d'éclosion, une augmentation significative des trajectoires circulaires est observée pour une concentration de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  de cuivre. Ce résultat semble indiquer une plus grande sensibilité des larves d'éclosion.

En présence de S-métolachlore, les larves issues d'éclosion ne présentent pas de modification de vitesse moyenne ou maximale de nage tandis que les larves d'Arcachon voient leur vitesse maximale diminuer dès une exposition à des concentrations environnementales basses de  $10 \text{ng.L}^{-1}$  et leur vitesse maximale pour des concentrations de  $100 \text{ng.L}^{-1}$ . En ce qui concerne les trajectoires, une tendance à l'augmentation des trajectoires circulaires des larves d'éclosion apparaît dès les concentrations environnementales (28 % en condition contrôle contre 45 % à  $10 \text{ng.L}^{-1}$ ) mais ne devient significative que vers  $100 \text{ng.L}^{-1}$ . Les mêmes tendances sont observées pour les larves d'Arcachon. Les larves d'Arcachon apparaissent donc plus sensibles au S-métolachlore que les larves d'éclosion pour les paramètres vitesse moyenne et maximale.

## Conclusion

Une nette tendance à l'augmentation des trajectoires circulaires est observée en présence de cuivre ou de S-métolachlore en dépit des trajectoires rectilignes démontrées comme correspondant au comportement « normal » des larves. Les larves issues des huîtres d'éclosion apparaissent plus sensibles aux concentrations environnementales en cuivre mais semblent globalement plus tolérantes au métolachlore que les larves issues des huîtres du bassin.





---

## Chapitre 8 - DISCUSSION GÉNÉRALE

---

## *Chapitre 8. Discussion générale*

L'ensemble du travail de thèse présenté dans ce manuscrit avait pour objectif principal de répondre à la question suivante :

### ***Quel est l'impact des polluants et du changement climatique sur les capacités de reproduction et le développement embryo-larvaire de l'huître ?***

Afin de répondre à cette problématique, une approche expérimentale a été mise en œuvre à travers l'utilisation du test embryo-larvaire sur l'huître creuse *Crassostrea gigas*. L'étude réalisée au cours de ce travail s'est focalisée sur deux provenances d'huîtres : des huîtres d'écloserie mais aussi des huîtres du milieu naturel : la lagune du Bassin d'Arcachon. Pour cette dernière, des huîtres sauvages ainsi que des huîtres cultivées de différents sites ont été prélevées au cours de deux campagnes successives pendant les saisons estivales 2013 et 2014. Les réponses écotoxicologiques, génétiques et comportementales des embryons exposés à deux polluants représentatifs de la contamination du bassin d'Arcachon à des concentrations environnementales ou supérieures sont discutées. C'est à partir de ces données et de leur interprétation que sont apportées des premières réponses quant aux problèmes récurrents de mortalité larvaire et de baisse de recrutement des huîtres creuses dans le Bassin d'Arcachon.

Dans un premier temps, la robustesse du test embryo-larvaire utilisé tout au long de cette étude sera discutée. L'étude de l'impact du facteur abiotique salinité permettra de déterminer les limites d'utilisation de ce test. Dans un deuxième temps, la capacité des huîtres d'écloserie à représenter une alternative pour étudier les réponses écotoxicologiques des huîtres du Bassin d'Arcachon sera analysée. Pour cela, l'étude des effets de plusieurs paramètres clés du milieu notamment, la température et la pollution sur les réponses embryotoxiques d'huîtres issues d'écloserie ou provenant du Bassin d'Arcachon sera réalisée. Dans un troisième temps, cette discussion abordera la compréhension des effets combinés des températures ou salinités en présence de différentes concentrations en contaminants sur les stocks d'huîtres voire, à plus large échelle, sur les productions futures. Une quatrième partie portera sur l'étude des paramètres *in situ* pouvant influencer les capacités du développement embryo-larvaire.

### 1. Robustesse et limite d'utilisation du test embryo-larvaire

Le bioessai sur embryons d'huître utilisé dans le cadre de ce travail est un test d'écotoxicité aiguë se concentrant sur les toutes premières heures du cycle de vie d'une espèce (stade embryo-larvaire). Les embryons et larves de bivalves sont parmi les organismes les plus fréquemment utilisés dans les bio-essais (AFNOR, 2009). Le test embryo-larvaire sur l'huître permet par exemple d'apporter des informations quant à l'impact des polluants présents dans l'environnement marin. Les effets du cuivre et du S-métolachlore, deux polluants bien représentés dans le Bassin d'Arcachon, sur le développement des larves D de l'huître creuse *Crassostrea gigas* ont déjà été étudiés précédemment mais uniquement sur des huîtres en provenance de l'écloserie de Guernesey et sans prendre en compte les effets combinés avec la température et la salinité (Mai et al., 2012). L'un des premiers objectifs de cette étude a donc été de comparer les résultats obtenus avec ces mêmes huîtres, afin de s'assurer de la robustesse du test embryo-larvaire. Pour cela, l'ensemble des résultats acquis au cours de ces trois années sur différents couples de géniteurs ont été moyennés dans les figures 57 et 58. Ainsi, les embryons issus de onze couples de géniteurs ont été soumis à trois concentrations en cuivre (1, 10 ou 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). De la même manière, les embryons issus de six couples de géniteurs ont été exposés à trois concentrations en S-métolachlore (10, 100 ou 1000  $\text{ng.L}^{-1}$ ). En présence de cuivre, une augmentation significative du pourcentage de malformations larvaires est observée dès les concentrations environnementales (Figure 57). Plus les concentrations en cuivre augmentent plus le pourcentage de malformations larvaires augmente significativement selon un effet dose réponse.

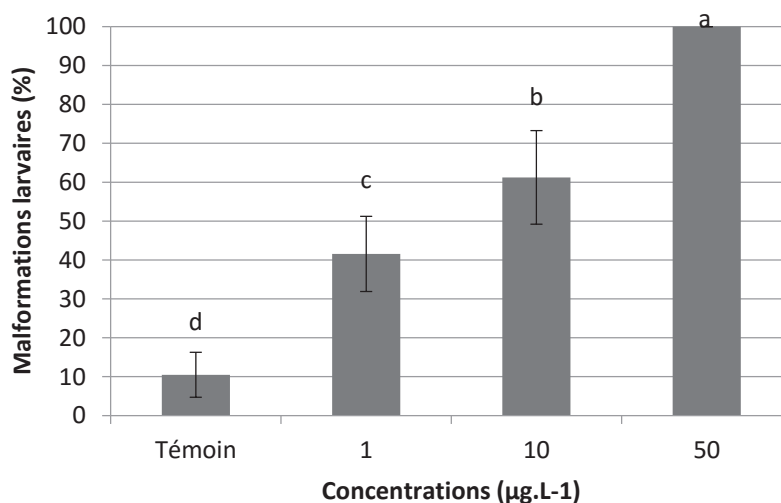


Figure 57 : Pourcentage moyen ( $\pm$  écart-type) de malformations larvaires suite à l'exposition à différentes concentrations en cuivre (1, 10 ou 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) de onze couples de géniteurs différents

## Chapitre 8- Discussion générale

Une augmentation significative du pourcentage de malformations larvaires est observée dès les concentrations environnementales basses de métolachlore (Figure 58). Il n'y a pas de différence significative entre les concentrations environnementales basses (10 ng.L<sup>-1</sup>) et hautes (100 ng.L<sup>-1</sup>), ni entre les concentrations de 100 et 1000 ng.L<sup>-1</sup>.

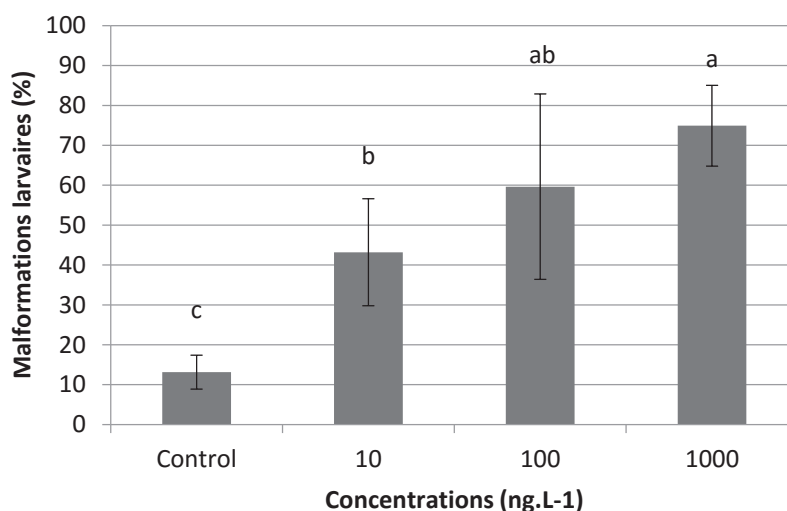


Figure 58 : Pourcentage moyen ( $\pm$  écart-type) de malformations larvaires suite à l'exposition à différentes concentrations en métolachlore (10,100 ou 1000 ng.L<sup>-1</sup>) de six couples de géniteurs différents

Ces essais ont permis de confirmer la robustesse du test embryoloarvaire sur l'huître creuse *Crassostrea gigas* en provenance de l'écloserie de Guernesey. Deux conditions sont nécessaires à la validation du test. Le pourcentage de malformations larvaires doit être inférieur à 20 % (AFNOR, 2009) en absence de contamination, ce qui est bien le cas pour l'ensemble des couples exploités au cours de cette étude. De plus, les réponses pour le contrôle positif (cuivre) doivent être reproductibles d'une expérience à l'autre et conformes à une valeur de référence. La sensibilité des larves vis-à-vis du cuivre sous sa forme Cu<sup>2+</sup> se mesure par le calcul de la concentration efficace moyenne (CE<sub>50</sub>). Celle-ci doit être comprise entre 6 et 16 µg.L<sup>-1</sup> (AFNOR, 2009) pour l'espèce *Crassostrea gigas*. Dans notre étude, une CE<sub>50</sub> de 7,1 µg.L<sup>-1</sup> (IC : 5-8.6) a été déterminée à la température optimale de 24 °C et une salinité de 33 u.s.i, confirmant la validité de nos tests par rapport aux critères de la norme AFNOR. Précédemment, des travaux de Huong Mai en 2012, avait déterminé une CE<sub>50</sub> pour le cuivre de 12,5 µg.L<sup>-1</sup> à la température de 24 °C et une salinité de 33 u.s.i. Bien que ces deux CE<sub>50</sub> soient comprises dans la gamme de réponse attendue pour cette espèce, nous pouvons voir néanmoins une plus grande sensibilité de réponse au Cu au cours de nos expériences. Nos résultats montrent que plus la concentration en cuivre augmente, plus le nombre de malformations augmentent significativement jusqu'à atteindre 100 % de malformations à des concentrations en cuivre cinquante fois supérieures à celles du milieu. Dans les travaux de Mai et al., 2012, des pourcentages de l'ordre de 40 % ont été

dénombrés en présence de concentrations environnementales en cuivre ( $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) et de 50 % à  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Ces résultats sont similaires à ceux obtenus au cours de notre étude, à savoir des pourcentages de 40 et 60 % respectivement pour les deux concentrations testées en cuivre. En présence de métolachlore, la CE50 n'a pu être déterminée mais une LOEC de  $10 \text{ ng.L}^{-1}$  a été obtenue. Ce résultat est similaire à ceux précédemment décrits (Mai et al., 2014, 2012) dans lesquels une NOEC de  $1 \text{ ng.L}^{-1}$  avait également été déterminée. Par conséquent, ces tests ont permis de montrer une certaine reproductibilité des résultats du test embryo-larvaire sur des individus d'huître creuse en provenance de l'écloserie de Guernesey, bien qu'une sensibilité un peu plus prononcée des embryons ait été observée dans notre étude.

Afin de définir les limites d'utilisation de ce test, des expériences ont été menées à des salinités allant de 18 à 33 u.s.i (18, 21, 24, 27, 30, 33 u.s.i) à la température optimale de développement de  $24^\circ\text{C}$ . Aux différentes salinités testées, plus de 20 % de malformations larvaires ont été observées aux deux plus basses salinités de 18 et 21 u.s.i. La limite de faisabilité du test embryo-larvaire se situe donc autour de 24 u.s.i en eau de mer de référence filtrée et à  $24^\circ\text{C}$ . Ce résultat est en accord avec la norme AFNOR n° T90-382 du test embryo-larvaire dans laquelle il est recommandé d'utiliser le test dans une gamme de salinités comprise entre 25 et 35 u.s.i pour l'huître.

## **2. Les huîtres de Guernesey en tant que proxie pour étudier la réponse des huîtres du Bassin d'Arcachon**

Les résultats obtenus avec les huîtres en provenance d'écloserie ne nous permettaient pas de conclure sur ce qui peut se passer pour des huîtres provenant directement du Bassin d'Arcachon. En effet, celles-ci sont soumises aux fluctuations continues de leur environnement, et ont pu développer des adaptations leur conférant une plus grande résistance aux conditions du milieu. C'est pourquoi, au cours de cette étude, des comparaisons des effets embryotoxiques observés sur les embryons et larves issus d'huîtres d'écloserie et prélevées directement dans le Bassin d'Arcachon ont été faites. Afin de s'assurer de la bonne représentativité des résultats acquis avec les huîtres d'écloserie, l'impact des polluants seuls ou couplés à différentes températures ont été étudiés. Les résultats d'embryotoxicité acquis avec les huîtres sauvages et les huîtres cultivées ont été comparés à ceux obtenus avec les huîtres d'écloserie. Ces résultats ont permis de montrer que l'huître d'écloserie est un bon modèle alternatif pour étudier l'impact du facteur abiotique température, dans une gamme allant de  $20^\circ\text{C}$  à  $30^\circ\text{C}$ . Elles réagissent en effet de la même manière que les huîtres cultivées ou sauvages du bassin. Pour les huîtres des deux origines, un développement normal des larves est possible entre  $22^\circ\text{C}$  et  $26^\circ\text{C}$  puis une augmentation significative des malformations larvaires apparaît au-delà et en deçà de ces températures. En condition optimale de développement (température de  $24^\circ\text{C}$  et salinité de 33 u.s.i),

## Chapitre 8- Discussion générale

les huîtres d'écloserie représentent une bonne alternative aux huîtres du bassin pour l'étude de l'impact des polluants car ces différentes populations d'huître répondent de la même manière aux différentes concentrations en polluants. Cependant les huîtres d'écloserie apparaissent plus sensibles au cuivre avec une  $CE_{50-24h}$  de  $9,8 \mu\text{g.L}^{-1}$  en comparaison des huîtres sauvages des Jacquets ou de Comprian ayant une  $CE_{50-24h}$  de  $14,8$  et  $10,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  respectivement. Au contraire les huîtres cultivées sont plus sensibles que les huîtres sauvages et répondent de la même manière que les huîtres d'écloserie avec une  $CE_{50-24h}$  de  $7,5$  et  $7,7 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le site des Jacquets et de Comprian respectivement. Les huîtres d'écloserie semblent également plus sensibles aux concentrations environnementales en métolachlore avec  $50 \pm 4 \%$  de malformations larvaires contre  $39 \pm 8 \%$  pour les larves d'huîtres provenant du Bassin. Les huîtres d'écloserie représentent également une bonne alternative afin d'étudier l'impact de la température couplée au cuivre ou au métolachlore. En effet ce modèle répond de manière similaire comparé aux huîtres d'Arcachon. Un effet synergique du cuivre couplé aux basses et hautes températures a été révélé pour les deux types de provenance. A  $20^\circ\text{C}$ , les larves provenant d'écloserie présentent une  $CE_{50-24h}$  de  $2,9 \mu\text{g.L}^{-1}$  correspondant à une valeur basse comprise dans les gammes de  $CE_{50-24h}$  des larves issues des huîtres sauvages et cultivées du Bassin d'Arcachon (allant de  $1,8$  à  $7,6 \mu\text{g.L}^{-1}$  et de  $2,7$  à  $4,8 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour les huîtres sauvages et cultivées respectivement). Même constat aux températures de  $28^\circ\text{C}$  où les larves issues d'écloserie présentent une  $CE_{50-24h}$  de  $5,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ , comprise dans la gamme de valeurs basses obtenues pour les larves d'Arcachon (de  $4,6$  à  $7 \mu\text{g.L}^{-1}$  et de  $4$  à  $9,9 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour les larves issues des huîtres sauvages et cultivées respectivement).

L'analyse comportementale a été menée aussi bien sur les larves issues des huîtres d'écloserie que sur les larves provenant du Bassin d'Arcachon. De manière générale, les huîtres d'écloserie semblent encore une fois une bonne alternative aux huîtres prélevées dans le bassin. Pour les deux types de provenance, des observations similaires ont été obtenues concernant les trajectoires adoptées par les larves en présence des deux polluants modèles (cuivre ou métolachlore). Une nette tendance à l'augmentation des trajectoires circulaires est observée en présence de cuivre ou de métolachlore au dépend des trajectoires rectilignes. Les larves issues des huîtres d'écloserie sont cependant apparues plus sensibles aux concentrations environnementales en cuivre pour le critère de vitesse moyenne. De plus, ces larves montrent des vitesses maximales significativement inférieures par rapport aux larves issues des huîtres d'Arcachon, pour les concentrations environnementales en métolachlore.

Les huîtres d'écloserie représentent donc globalement un bon proxy pour étudier l'impact des polluants et des températures sur le développement embryo-larvaire et les capacités natatoires des larves D de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. L'avantage majeur à utiliser des individus provenant

d'écloserie est que des huîtres matures sont produites pendant toute l'année rendant possible la réalisation du test embryo-larvaire pendant la majeure partie de l'année. A la différence, les huîtres provenant du milieu naturel ne sont matures qu'en période estivale, soit deux ou trois mois dans l'année, période pouvant se révéler relativement courte si les huîtres se mettent à pondre précocement.

### 3. Effets des polluants et des facteurs abiotiques : salinité et température

La survie et la croissance des organismes marins, notamment des larves de mollusques bivalves, sont influencées par les qualités physico-chimiques de l'eau dans laquelle ils se développent. Parmi les facteurs connus pour influencer sur les larves, la température et la salinité sont l'objet de nombreuses études (Bayne, 1983). Bien qu'il s'agisse d'espèces élevées dans une gamme étendue de températures et de salinités, comme c'est le cas de *Crassostrea gigas*, les taxons marins présentent des préférences thermiques et halins. La réussite du cycle de vie de l'espèce, est dépendante notamment de la gamme de variations de ces deux paramètres. Le bon déroulement de ce cycle peut se retrouver affecté lorsque ces paramètres atteignent des valeurs critiques situées au-delà ou en deçà des exigences de l'espèce. Ces préférences, bien que différents, concernent aussi bien les stades adultes que les premiers stades de vie des espèces en question. Ceci explique en grande partie que le captage de l'huître creuse n'atteigne des proportions très importantes que dans deux bassins ostréicoles français, Marennes-Oléron et Arcachon dans lesquels les gammes de température et de salinité sont assez proches des préférences de l'espèce. L'impact du cuivre et du métolachlore sur le développement embryo larvaire de l'huître creuse *C. gigas* a déjà été abordé lors d'études précédentes (His and Seaman, 1993; Mai et al., 2014, 2013, 2012). La robustesse des résultats obtenus avec le test embryo-larvaire ayant été vérifiée et la bonne représentativité du modèle biologique issu de l'écloserie de Guernesey ayant été validée, l'étude des paramètres salinités et températures couplés aux polluants va être discutée. *C. gigas* est considérée comme une espèce euryhaline (His et al., 1989) puisqu'elle peut vivre à des optimums de salinités entre 20 et 25 u.s.i mais peut également survivre au-delà de 35 u.s.i ou frayer en dessous de 10 u.s.i (FAO, 2015). En raison du changement climatique, une augmentation de la pluviométrie aux hautes latitudes devrait provoquer un apport d'eau douce dans l'Atlantique Nord entraînant une diminution des salinités. La baisse des salinités couplée à la présence du cuivre pourrait provoquer des effets synergiques d'autant plus importants que la salinité est basse, comprise entre 18 et 21 u.s.i. La gamme de salinités permettant un développement normal des larves D en présence de concentrations environnementales en cuivre est comprise entre 24 et 33 u.s.i. Les données obtenues depuis plusieurs années par le réseau français d'observation des océans (SOMLIT, 2015) ont révélé que des salinités inférieures à 24 u.s.i ne sont pas des salinités se produisant



## Chapitre 8- Discussion générale

en période de reproduction des huîtres dans le Bassin d'Arcachon. Ainsi, dans l'état actuel des choses, les changements saisonniers de salinité sont peu susceptibles d'être un problème majeur pour le développement des embryons de *C. gigas* dans le Bassin d'Arcachon. Ces résultats sont complémentaires des analyses réalisées par l'institut français IFREMER qui n'ont révélé aucun impact des salinités rencontrées dans les eaux du Bassin sur la survie des larves d'huître creuse (Auby et al., 2014). Cependant, il ne faut pas oublier que l'impact du cuivre seul sur les huîtres du milieu a été clairement mis en évidence au cours de cette étude, que ce soit sur les huîtres en provenance d'écloserie (Gamain et al., 2016b) ou bien sur les huîtres cultivées ou sauvages du Bassin (Gamain et al., 2016a). Une augmentation par un facteur six du pourcentage de malformations larvaires entre les conditions contrôles et les concentrations environnementales a en effet été observée. Des recherches antérieures ont démontré que certains éléments métalliques peuvent avoir un effet sur la synthèse des acides nucléiques lors de l'embryogenèse. Cet effet se traduirait par des phénomènes toxiques, lorsqu'à un âge plus avancé, la larve a besoin de ces molécules pour son développement (Deslous-Paoli, 1981). Ceci pose alors le questionnement du devenir des larves impactées par le cuivre dès les premiers stades de développement. L'analyse du comportement sur les larves issues des huîtres sauvages et cultivées du Bassin a permis de mettre en évidence une tendance à l'augmentation de la proportion des larves ayant une trajectoire circulaire suite à une exposition à des concentrations environnementales en cuivre. Au contraire, en condition témoin, les larves adoptent majoritairement une trajectoire rectiligne, comportement déterminé comme représentatif des larves en bonnes conditions. Les mêmes résultats ont été obtenus avec les larves issues d'écloserie. A la lecture des vidéos, il apparaît clairement que les larves ayant ce comportement circulaire finissent in fine par sédimenter. Ceci sous-entend que ces larves ne poursuivront pas leur développement jusqu'à la fixation et donc n'interviendront pas dans le renouvellement de la population. Se pose alors le problème du stock futur d'huîtres d'autant plus si les concentrations en contaminants ne cessent d'augmenter. En effet, plus les concentrations en cuivre augmentent, plus les comportements natatoires aberrants augmentent eux aussi, jusqu'à atteindre, à des concentrations extrêmes de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , un arrêt total de mouvement. Effectivement, ces larves ne pourront pas se développer correctement car ces fortes concentrations provoquent des arrêts de segmentation. Les faibles salinités augmentent la sensibilité des embryons d'huîtres à des faibles concentrations de métolachlore (de l'ordre de  $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ceci dès les salinités de 24 u.s.i. L'hypothèse de l'accroissement de la biodisponibilité du métolachlore aux faibles salinités peut alors être émise, ou d'un changement dans la physiologie des larves D, limitant l'élimination ou la dégradation du métolachlore. De la même manière que pour le cuivre, ces concentrations en métolachlore couramment retrouvées dans les eaux du Bassin tendent à augmenter le pourcentage de trajectoires circulaires des larves D. Plus les

## Chapitre 8- Discussion générale

concentrations augmentent plus ces comportements aberrants sont importants. Cependant, les facteurs salinité ou polluants ne sont pas les seuls à perturber le bon développement des larves D. En l'absence de contamination, 4 °C d'écart par rapport à la température optimale de développement conduit à une augmentation significative du pourcentage de malformations larvaires, pour les huîtres de Comprian et des Jacquets. Ces deux sites sont sous l'influence de deux chenaux différents (chenal du Teychan et chenal d'Arès respectivement). Dans le Bassin d'Arcachon, 22 et 24 °C sont des températures couramment rencontrées dans les eaux pendant la période de reproduction des huîtres. La moyenne des températures mesurées pour l'eau de surface pendant le frai est de  $22,1 \pm 1,6$  °C et  $22,3 \pm 1,7$  °C à Les Jacquets et Comprian respectivement de 2007 à 2014 (SOMLIT, 2015). Donc, ces températures correspondent à des températures idéales pour le développement des larves D et induisent moins de 20 % d'anomalies larvaires. Cependant bien que 20 °C représente une température pour laquelle le pourcentage de malformations larvaires augmente significativement, cette température n'est que ponctuellement observée en période estivale au moment de la ponte et du développement des huîtres. Il faut aussi considérer qu'à cette température, plus de 30 % des larves se développent parfaitement en larves D. Une étude conduite sur les huîtres issues du Bassin d'Arcachon a démontré que la ponte ne se déclenche pas en dessous de 20 °C (His, 1976). Ceci laisse donc penser que des températures supérieures à 20 °C sont nécessaires à un bon développement embryo-larvaire. L'ensemble des résultats acquis suggère que le facteur température pris isolément dans la lagune n'est pas le facteur causal majeur à l'origine des problèmes de recrutement de l'espèce *C. gigas* dans le bassin d'Arcachon. En présence de différentes concentrations en contaminants, seules les températures de 20 °C et 28 °C ont été testées. Ces expériences ont montré un effet synergique des polluants et de la température sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse. Bien que les larves d'huîtres autochtones apparaissent plus vulnérables à l'effet de basses températures couplées aux polluants, elles sont également plus sensibles à une augmentation de la température. Ceci suggère qu'une future augmentation des températures de surface en réponse au changement climatique pourrait impacter fortement le développement embryo-larvaire et donc le recrutement de l'huître creuse dans le bassin d'Arcachon. L'analyse du comportement a permis de montrer que plus il y a de malformations, plus le comportement des larves devient erratique, mettant en question leur évolution jusqu'au stade de naissain. L'analyse prédictive qui a été réalisée au cours de cette étude met en évidence qu'à des températures élevées (26 °C), des salinités de l'eau de mer plus faibles (24 u.s.i) et des concentrations en polluants légèrement supérieures, un très faible pourcentage de larves arrive à se développer normalement (<10 %). La FAO dans son rapport de 2015 (FAO, 2015) conclue déjà sur le fait que les variations de température et d'autres éléments résultant du changement climatique auront un impact profond sur la pêche et l'aquaculture, avec des conséquences

## Chapitre 8- Discussion générale

significatives sur la sécurité alimentaire pour certaines populations. Dans le bassin d'Arcachon, l'évolution de ces paramètres pourrait augmenter la fréquence et/ou la gravité des crises ostréicoles par un défaut de captage suite à l'augmentation du pourcentage de malformations larvaires et d'arrêt de développement. A plus long terme, la filière ostréicole pourrait rencontrer des problèmes pour la pérennité de son activité dans le bassin d'Arcachon. Dans le cadre de la survie larvaire, le facteur nutrition reste largement inexploré dans le bassin d'Arcachon. Il est possible que ce facteur amplifie également l'effet climatique (Bernard, 2011). L'intensité du captage dépend entre autres de la survie larvaire. Des études précédentes ont montré que la survie des cohortes dépend de la température de l'eau dans laquelle elles se développent à la fois directement (comme nous venons de le voir ici) mais aussi indirectement. En effet les changements de températures peuvent avoir une influence sur la quantité de nourriture disponible pour les larves : notamment l'abondance des cellules phytoplanctoniques (nanoplancton), qui semblent constituer la source majeure de nourriture (Auby and Maurer, 2004). Il a clairement été démontré que les sources de nourriture des larves de bivalves dans le milieu naturel sont multiples, mais lorsqu'elles ont le choix, les larves sont capables de sélectionner activement leur nourriture sur des critères de taille et de qualité biochimique (Auby and Maurer, 2004). Cependant, des données récentes ont montré que la qualité du pool nutritif, plus que sa quantité, semble être modifiée en raison du changement climatique, au profit de taxa à faible qualité nutritive. Cette modification peut avoir un impact sur le développement des larves. De plus, ces changements de qualité/quantité du pool nutritif en lien avec le changement climatique peuvent aussi avoir une influence sur la nutrition des géniteurs, modifiant, en cascade, l'effort de reproduction, le nombre de petites larves et donc l'intensité de captage.

La variabilité de recrutements observée au cours de ces dernières années pourrait ainsi être expliquée par le paramètre de température. Cependant, il a été observé au cours de ces recherches que des températures de 22 °C à 26 °C permettent un développement normal des larves et correspondent aux gammes de températures observées à Comprian ou aux Jacquets entre 2008 et 2014. De 1985 à 2014 l'Ifremer a réalisé un suivi des captages d'huître sur le bassin d'Arcachon. Les taux de captage sont très différents d'une année à l'autre allant de  $45 \pm 30$  en 2002 à  $21578 \pm 10799$  naissains/tuile en 2014 (Annexe 5). Pour la période qui nous intéresse ici ce taux de captage est passé de  $6236 \pm 3596$  en 2013 à  $21578 \pm 10799$  en 2014. Il faut noter que les températures de surface, les salinités et les concentrations environnementales de Cu et métolachlore mesurées ne présentent pas de différence significative entre les deux années étudiées. Il est donc fort probable que ces trois facteurs ne soient pas responsables des différences de captage observés entre 2013 et 2014. Cependant, il faut préciser que les deux années d'étude ont été caractérisées par des captages excellents en comparaison des années précédentes. C'est pourquoi la poursuite de ces essais dans les années futures nous

permettrait de déterminer si un lien existe entre effet des températures et des polluants, qualité et survie des larves et qualité du captage.

#### **4. Réponse embryo-larvaires en fonction des paramètres in situ**

Le Bassin d’Arcachon est la principale et la plus vaste lagune côtière sur la côte Atlantique. Par son ouverture sur l’océan, le Bassin d’Arcachon offre des conditions de vie très diverses mais fluctuantes. La marée et l’hydrodynamisme y imposent des contraintes déterminantes. C’est ainsi que les variations des conditions physico-chimiques ont des impacts multiples pour les espèces occupant ce milieu. La topographie et la nature du fond intéressent les espèces dites benthiques comme les huîtres sauvages. Cependant, dans le Bassin d’Arcachon, les naissains fixés sur les collecteurs proviennent aussi bien des huîtres sauvages que des huîtres cultivées. Peu d’études ont été réalisées sur des embryons provenant d’huîtres du milieu en raison notamment de la période très courte de reproduction (Damien et al., 2006; His, 1991; Weng and Wang, 2014). Cependant, étudier la reproduction des huîtres habitant ce milieu si complexe permet de déterminer si le mode et les conditions de vie des huîtres peuvent être un des facteurs explicatifs de la variabilité des recrutements observés ces dernières années. Pour aller plus loin dans cette étude, différents sites de prélèvements ont été sélectionnés au cours de deux campagnes en 2013 et 2014. Les recherches menées récemment par le réseau Féliba avaient en effet démontré que selon les sites, des succès de reproduction différents pouvaient être observés. La question de l’influence de la provenance des géniteurs sur le développement de la descendance est donc un facteur qui a été pris en compte dans notre étude. Ces deux années de prélèvement ont également permis de déterminer si le facteur temporel pouvait jouer un rôle sur le développement embryo-larvaire. Les résultats de cette étude ont montré que les paramètres mode de vie (sauvages ou cultivées), temporalité (comparaison des deux années) et date de prélèvement ne sont pas corrélées à la sensibilité des embryons aux polluants et donc à leur capacité à se développer normalement en larves D. Au cours de la première campagne menée en 2013, les sites de Grand Banc et du Tès ont été sélectionnés. Les huîtres prélevées sur ces deux sites, sous l’influence de masses d’eau bien distinctes, les eaux néritiques externes ou internes respectivement, n’ont pas révélé de différences de sensibilité des embryons aux différentes concentrations en polluants. Au cours de la deuxième campagne menée en 2014, deux autres sites ont été sélectionnés. Le réseau Féliba s’est intéressé à la fécondité de l’huître creuse dans le bassin d’Arcachon en 2013 en lien avec la qualité de l’eau. Les résultats ont montré la présence d’huîtres avec des gonades peu développées à la fin du mois de juin dans le sud-Est du Bassin, c’est-à-dire dans les zones situées dans la zone interne du bassin, notamment vers Comprian. Jusqu’à 60 % d’huîtres présentaient des gonades non développées. Au contraire, au Nord-Ouest et au Sud-Ouest du Bassin, les huîtres présentent des

## Chapitre 8- Discussion générale

gonades globalement plus développées. Il a donc été décidé pour cette deuxième campagne, d'orienter nos recherches sur deux autres sites bien distincts : Comprian, situé dans les eaux néritiques internes et au niveau du chenal du Teychan, et Les Jacquets, situé au Nord-ouest, au niveau du chenal d'Arès. De plus, Comprian se situe plus dans la partie interne de la baie, à proximité de l'embouchure de la Leyre, qui représente l'un des vecteurs majoritaires de pesticides dans le bassin. Ces deux sites ont donc été choisis pour leur différence de maturation des gonades, mais aussi par le fait qu'ils sont situés au niveau de deux chenaux différents. La surface qui alimente le Teychan est plus importante que celle alimentant le chenal d'Arès, les volumes y sont donc plus importants : à marée descendante, le Teychan draine 2/3 des volumes d'eau sortant contre 1/3 pour le chenal d'Arès. Malgré ces différences de caractéristiques entre les sites d'étude, aucune influence des sites sur la capacité des embryons à se développer en larves D n'a été observée. Cependant, nous avons montré qu'au niveau génétique, les larves ont la capacité de se défendre face à la contamination en cuivre ou en métolachlore. De manière générale, les huîtres prélevées au niveau de Comprian réagissent de manière plus importante à la présence des polluants par induction de différents gènes impliqués dans la détoxification, le métabolisme mitochondriale, la réponse au stress oxydatif ou encore le métabolisme des lipides. Les MTS appartiennent à une famille de protéines ayant une grande capacité à lier les ions métalliques (Ruttkay-Nedecky et al., 2013). Elles ont généralement quatre fonctions clés : régulation homéostatique des métaux essentiels, la détoxification des métaux toxiques, la protection contre le stress oxydatif et les mécanismes neuroprotecteurs (Mao et al., 2012). De plus, les espèces réactives de l'oxygène peuvent être produites par certains stimuli externes (Chen et al., 2007) et conduire ainsi à la surexpression de gènes liés à ce stress, comme c'est le cas ici. Les cellules des larves d'huître mettent ainsi en place des stratégies défensives pour lutter contre ce stress oxydatif comme la superoxyde dismutase mitochondriale (*sodmt*) et la glutathion peroxydase (*gpx*). Ces gènes représentent une adaptation importante au stress induit par les polluants (Richardson et al., 2008). La mise en place de ces mécanismes de défenses nécessite de l'énergie. C'est pourquoi les gènes impliqués dans le métabolisme des lipides sont surexprimés afin d'utiliser l'énergie stockée sous la forme de triglycérides. Les caractéristiques de ce site (Comprian), sous l'influence directe des apports en pesticide des tributaires, ont pu contribuer à ce que les géniteurs présents dans cette zone aient pu développer des mécanismes de défense face aux contaminants. Ces mécanismes ont pu être transmis à leur descendance, ce qui expliquerait pourquoi les larves issues de ces géniteurs ont réagi de manière plus importante. Des recherches précédentes ont permis de mettre en avant que lorsque des huîtres vivent dans un environnement plus contaminé, leur descendance est moins sensible à la contamination (Damiens et al., 2006; Weng and Wang, 2014).

## Chapitre 8- Discussion générale

De plus, cette étude génétique a permis de voir que les larves D issues des huîtres sauvages étaient capables elles aussi de mobiliser leurs systèmes de défense de façon plus importante que les larves issues des huîtres cultivées. Ces huîtres sont présentes tout au long de leur vie, et donc de génération en génération dans l'environnement. De plus, de par leur mode de vie benthique, elles sont sous l'influence des apports en contaminants de la colonne d'eau et du sédiment via la remise en suspension de ceux-ci. On peut penser que le mode de vie des géniteurs pourrait influencer la capacité de la descendance à faire face à la contamination soit en mobilisant des réserves énergétiques plus importantes soit en activant de façon plus précoce ou plus efficace des systèmes de défense. Ces résultats ont également permis d'étoffer les données concernant la bioaccumulation du cuivre et dans une moindre mesure du métolachlore dans les tissus des géniteurs en fonction de leur mode de vie. Finalement, les huîtres sauvages sont apparues comme étant les individus bioaccumulant le plus de cuivre en comparaison des cultivées. Ceci pourrait expliquer pourquoi les larves D issues d'huîtres sauvages sont plus à même de faire face à la contamination.



---

## Chapitre 9 - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---



## Chapitre 9 – Conclusions et perspectives

Au vu de l'impact du cuivre sur le développement embryonnaire des huîtres, des solutions doivent être mises en place afin de réduire les concentrations présentes dans le bassin d'Arcachon. Celles-ci ne cessent en effet de croître dans la colonne d'eau, et les concentrations de ce métal dans la matrice huître est en nette augmentation depuis des années. Ce métal est utilisé en agriculture en tant que pesticide mais il est aussi utilisé en tant que molécule antifouling. Or la fréquentation nautique est supérieure en période estivale. De nouveaux composés alternatifs ont été étudiés. Parmi ceux-ci, un antifouling composé d'un film polymère de la classe particulière des hydrogels avec comme composé actif le chlorure de benzalkonium : BCI. Ce nouvel antifouling n'affecte pas la croissance des larves d'huîtres puisqu'aucune différence de taille (hauteur, longueur et épaisseur de la coquille) n'a été observée par rapport aux conditions témoin, ni de différence de poids. La croissance larvaire n'est pas non plus affectée. La viabilité des gamètes, des embryons et des larves ne se retrouvent pas modifiée (His et al., 1996). En parallèle, afin de réduire la présence du S-métolachlore dans les eaux du Bassin, il faudrait intensifier les bonnes pratiques agricoles, et mettre en place une agriculture beaucoup plus raisonnée. Ces activités ne sont pas les seules responsables de la pollution en pesticides dans les eaux du bassin (jardinages amateurs et communaux). Le maintien voire l'accentuation des programmes zéro phyto développé dans les Agenda 21 des communes du Bassin devrait être renforcé, avec une sensibilisation des particuliers, souvent fort consommateurs de pesticides.

L'analyse comportementale ayant clairement montré un impact du cuivre et du métolachlore sur le comportement de nage des larves d'huître, nous pouvons nous demander si les larves D issues de ces différents traitements peuvent, in fine, se fixer et évoluer vers le stade naissain et en quelle proportion. En effet dans le bassin, nous avons vu qu'un très faible pourcentage de larves D atteint le stade de fixation (autour d'un maximum de 2 %). Pour cela une expérience de télécaptage pourrait être mise en place. Le télécaptage consiste au captage en conditions contrôlées de larves oeillées d'huîtres. En partant du même principe, des larves D pourraient être produites en laboratoire puis élevées jusqu'au stade naissain en présence ou non de polluants pour mesurer l'incidence sur le taux de captage sur micro brisures. Des prélèvements réguliers de larves seraient réalisés afin d'estimer la survie et la qualité des larves D et des stades de développement ultérieurs, mais aussi leur comportement natatoire. A la fin de la période, un dénombrement du nombre de larves s'étant fixées sur micro brisure serait réalisé afin d'estimer la proportion de larves en fixation par rapport au stock de larves D de départ, et mettre en relation cette proportion avec les malformations et troubles de comportement observés au cours de leur développement.

Afin de compléter nos travaux, des expériences concernant l'impact de la salinité couplée ou non aux polluants devraient être réalisées sur les huîtres d'Arcachon. Celles-ci permettraient de comparer les résultats obtenus entre les deux provenances d'huîtres (du milieu ou d'écloserie) et de valider ou non

## Chapitre 9 – Conclusions et perspectives

l'utilisation des huîtres de Guernesey en modèle alternatif pour étudier l'impact de ce facteur sur les huîtres du Bassin. De même, de nouvelles expériences couplant variation de salinités, variation de températures, et de concentrations en polluants, seuls ou en cocktail, nous permettrait d'avoir une vision plus intégrée de l'impact de ces trois paramètres sur le développement des embryons d'huître creuse. Enfin, une étude génétique comparée entre huîtres natives du Bassin et huîtres d'écloserie nous permettrait de mieux comprendre les mécanismes de résistances mobilisés par les premières pour faire face à la pollution.

Dans l'objectif de mieux comprendre la production et le développement des larves dans le milieu, des collectes in situ de larves D au moment de la reproduction pourraient être réalisées en différents sites du bassin d'Arcachon afin de déterminer la fréquence de déformation des larves. En effet, les pêches réalisées par Ifremer dans le cadre du suivi de la reproduction de l'huître creuse dans le bassin d'Arcachon ne montrent essentiellement que des larves D majoritairement bien formées (communication personnelle). Cependant, les larves D malformées présentent des comportements aberrants conduisant certainement à une sédimentation des individus. Il serait alors très probable que les larves pêchées dans le Bassin ne correspondent finalement qu'aux larves capable de nager normalement et donc ne présentant pas de malformations, d'où un pourcentage élevé de larves bien formées. C'est pourquoi, en parallèle, des reproductions en laboratoire avec des huîtres d'écloserie pourraient être réalisées pour obtenir des embryons qui seraient exposés *in situ*, en différents points du bassin, et soumis aux variations du milieu. Ainsi une comparaison entre les larves issues naturellement du milieu et celle obtenues avec des huîtres d'écloserie permettrait d'étudier les différences de réponse mais aussi de savoir quelle proportion de larves arrive réellement au stade de larves D in situ. En fonction des résultats de ces expériences, l'utilisation des embryons produits en laboratoire puis engagés in situ pourrait servir de bioindicateur des perturbations environnementales avec l'avantage d'obtenir des résultats exploitables en 24h.

De plus, les analyses génétiques ont mis en évidence une plus grande capacité des larves issues des huîtres de Compiègne à induire des mécanismes de défenses face aux contaminants. Elles ont aussi permis de voir que les larves issues des huîtres sauvages induisent de façon plus importante ces mécanismes de défense en comparaison des cultivées. Les mécanismes moléculaires concernant le génome ainsi que l'expression des gènes peuvent être influencés par l'environnement et l'histoire individuelle. Ces mécanismes peuvent être potentiellement transmissibles d'une génération à l'autre. C'est pourquoi, afin de déterminer l'origine de ces différences et confirmer ou non l'hypothèse d'une transmission des capacités de défense acquis par des géniteurs à la descendance dû à leur histoire de vie, l'épigénétique pourrait être un bon outil afin d'observer les effets transgénérationnels des

## Chapitre 9 – Conclusions et perspectives

contaminants ou permettrait de mettre en évidence des phénomènes d'adaptations des huîtres du bassin. En effet face aux contaminants, l'une des principales modifications de l'ADN est la méthylation. Les géniteurs du bassin pourraient donc présenter des gènes dont les séquences promotrices sont plus ou moins méthylées. Ces méthylations peuvent induire des répressions et surtout être transmises à la descendance. Les échantillons prélevés au cours de la campagne de 2014 vont ainsi servir à apporter des éléments de réponses sur ces mécanismes épigénétiques.

L'ensemble des résultats acquis pourrait être intégré dans un modèle de dynamique de population. Ce modèle permettrait de décrire le fonctionnement des populations d'huîtres du bassin d'Arcachon et prédire leur évolution future en fonction des évolutions climatiques locales ainsi que de la contamination du bassin.

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

## Bibliographie

- Aaseth, J., Norseth, T., 1986. Handbook on the toxicology of metals 2, in: New York, NY : Elsevier Science Publishers. pp. 233–254.
- Adams, S.M., 2005. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems, in: Marine Pollution Bulletin. pp. 649–657. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.11.040
- 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 biomarkers for assessing the effects of pollutant stress on fish. Mar. Environ. Res. 28, 459–464.
- Adour-Garonne, A. de l'eau, 2013. Agence de l'eau Adour-Garonne - Journée technique « Qualité des eaux littorales : suivi et enjeux » Jeudi 20 juin 2013 – Espace culturel de Biganos (33) 1–5.
- Aerts, S., Haesbroeck, G., Ruwet, C., 2015. Multivariate coefficients of variation : Comparison and influence functions. J. Multivar. Anal. 142, 183–198. doi:10.1016/j.jmva.2015.08.006
- AFNOR XP T 90-382, 2009. Water quality - Bioindicator of potential toxicity in aqueous media - Determination of the potential toxicity of aqueous samples on bivalves embryo-larval development.
- Agreste Primeur, 2014. Chiffres et données : Recensement de la conchyliculture 2012. 7200 tonnes de coquillages commercialisés en Aquitaine 1–4.
- Akcha, F., Spagnol, C., Rouxel, J., 2012. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. Aquat. Toxicol. 106-107, 104–113. doi:10.1016/j.aquatox.2011.10.018
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquat. Toxicol. 76, 160–202. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015
- ARCHYD, 2015. Regional network. URL <http://www.ifremer.fr/surval2/#>
- Auby, I., 1991. Contribution à l'étude des herbiers de *Zostera noltii* dans le Bassin d' Arcachon : dynamique, production et dégradation, macrofaune associée. Volume 1 357.
- Auby, I., Bocquene, G., Quiniou, F., Dreno, J.P., 2007. Etat de la contamination du Bassin d'Arcachon par les insecticides et les herbicides sur la période 2005-2006. Impact environnemental 24, 108.
- Auby, I., Bost, C.-A., Budzinski, H., Dalloyau, S., Desternes, A., Belles, A., Trut, G., Plus, M., Pere, C., Couzi, L., Feigne, C., Steinmetz, J., 2011. Régression des herbiers de zostères dans le Bassin d' Arcachon : état des lieux et recherche des causes Régression des herbiers de zostères dans le Bassin d' Arcachon : état des lieux et recherche des causes. Ifremer ODE LER Arcachon 195.
- Auby, I., Maurer, D., 2004. Etude de la reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon. Ifremer.
- Auby, I., Maurer, D., 2014. Rôle des communautés phytoplanctoniques sur la reproduction de l' huître creuse ( *Crassostrea gigas* ) dans le bassin d' Arcachon 48 p.
- Auby, I., Maurer, D., Connès, C., Barbier, C., Perrière-Rumèbe, M., Rigouin, L., Tournaire, M.-P., 2012. Reproduction de l' huître creuse dans le Bassin d' Arcachon Année 2012. IFREMER 1–63.

## Bibliographie

Auby, I., Maurer, D., Passoni, S., Heroin, D., Rigouin, L., Méteigner, C., Perrière-Rumèbe, M., Tournaire, M.-P., 2014. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon Année 2014. Ifremer 1-55.

Auby, I., Oger-Jeanneret, H., Sauriau, P.-G., Hily, C., Barillé, L., 2010. Angiospermes des côtes françaises Manche-Atlantique. Propositions pour un indicateur DCE et premières estimations de la qualité. Annexe 2 : Fiches contenant les données sur les herbiers des différentes masses d'eau suivies dans le cadre de la DCE 152p.

Auffret, M., Oubella, R., 1997. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: In vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. Comp. Biochem. Physiol. - A Physiol. 118, 705–712. doi:10.1016/S0300-9629(97)00017-0

Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Le Floch, S., Renault, T., 2008. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Toxicol. Vitro. 22, 1610–1617. doi:10.1016/j.tiv.2008.04.011

Baize, D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France), in: Institut National de La Recherche Agronomique INRA. p. 409.

Barouki, R., 2006. Stress oxydant et vieillissement. Medecine/Sciences 22, 266–272. doi:10.1016/S0985-0562(02)00173-5

Barros, P., Sobral, P., Range, P., Chicharo, L., Matias, D., 2013. Effects of sea-water acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas*. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 440, 200–206. doi:10.1016/j.jembe.2012.12.014

Bayne, B., 1983. Physiological ecology of marine molluscan larvae, in: In: N.H. Verdonk (Eds.), The Mollusca. pp. 299–343.

BCI Engineering and Scientists, Inc. 2001. Laboratory analysis report, Brevard Teaching and Research Laboratories, Inc. Prepared by Shailesh Patel. Daytona Beach, FL

Bebianno, M.J., Serafim, M. a., 1998. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs *Mytilus galloprovincialis* and *Ruditapes decussatus*. Sci. Total Environ. 214, 123–131. doi:10.1016/S0048-9697(98)00059-X

Beiras, R., Albentosa, M., 2004. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals; implications for the implementation of seawater quality criteria. Aquaculture 230, 205–213. doi:10.1016/S0044-8486(03)00432-0

Beiras, R., His, E., 1995. Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival and growth of *Mytilus galloprovincialis* mussel larvae. Mar. Ecol. Prog. Ser. 126, 185–189. doi:10.3354/meps126185

Belin, C., Neaud-Masson, N., 2012. Cahier de Procédures REPHY 2012-2013 82.

Ben Kheder, R., 2007. Étude sur le développement larvaire de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) en conditions contrôlées : recherche d'indices de qualité. 1-241.

## Bibliographie

Bernard, G., Bonhomme, P., Boudouresque, C.F., 2005. Recovery of the seagrass *Zostera marina* in a disturbed Mediterranean lagoon (Etang de Berre, Bouches-du-Rhône, Southern France). *Hydrobiologia* 539, 157–161. doi:10.1007/s10750-004-3080-7

Bernard, I., 2011. Écologie de la reproduction de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, sur les côtes atlantiques françaises : Vers une explication de la variabilité du captage. 1-198

Bernstein, L., Bosch, P., Canziani, O., Chen, Z., Christ, R., Davidson, O., Hare, W., Huq, S., Karoly, D., Kattsov, V., Kundzewicz, Z., Liu, J., Lohmann, U., Manning, M., Matsuno, T., Menne, B., Metz, B., Mirza, M., Nicholls, N., Nurse, L., Pachauri, R., Palutikof, J., Parry, M., Qin, D., Ravindranath, N., Reisinger, A., Ren, J., Riahi, K., Rosenzweig, C., Rusticucci, M., Schneider, S., Sokona, Y., Solomon, S., Stott, P., Stouffer, R., Sugiyama, T., Swart, R., Tirpak, D., Vogel, C., Yohe, G., 2007. Changements Climatiques 2007 Rapport de synthèse.

Bessi, H., ElAlami, M., 2009. Les bio-essais dans l'évaluation d'impact des polluants sur les écosystèmes dulçaquicoles. *Les Technol. Lab.* n°15 16–22.

Bijoux, H., 2014. Étude de l'impact des contaminants chimiques du Bassin d'Arcachon sur l'huître creuse *Crassostrea gigas* ; Approche in situ et expérimentale. 1-387.

Bird, A., 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396–398. doi:10.1038/nature05913

Bisson, M., Houeix, N., Gay, G., Lacroix, G., Lefevre, J.P., Magaud, H., Tissot, S., Migne, V., Morin, A., 2005. Cuivre et ses dérivés. *INERIS* 1–66.

Blanchet, H., 2004. Structure et Fonctionnement des peuplements benthiques du Bassin D'Arcachon 1-223.

Bos, A.R., Bouma, T.J., de Kort, G.L.J., van Katwijk, M.M., 2007. Ecosystem engineering by annual intertidal seagrass beds: Sediment accretion and modification. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 74, 344–348. doi:10.1016/j.ecss.2007.04.006

Bouchet, J.-M., Deltreil, J.-P., Manaud, F., Maurer, D., Triff, G., 1997. Etude intégrée du Bassin d'Arcachon. *IFREMER Tome 5*, 1-129.

Bouilly, K., Gagnaire, B., Bonnard, M., Thomasguyon, H., Renault, T., Miramand, P., Lapegue, S., 2006. Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 78, 149–156. doi:10.1016/j.aquatox.2006.02.028

Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004a. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, 147–157. doi:10.1016/j.gene.2003.12.027

Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004b. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *Gene, an Int. J. genes genomes* 272, 147–157. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04960.x

Brenko, M.H., Calabrese, A., 1969. The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 4, 224–226.

## Bibliographie

Brunel, S., Fraslin, C., Kuperminc, M., Perras, M., Prevost, J., 2013. Agriculture littorale du Bassin d'Arcachon - Projet « Littoral, Interface terre-mer ». AgroParisTech 1–35.

Buck, K.N., Ross, J.R.M., Russell Flegal, a., Bruland, K.W., 2007. A review of total dissolved copper and its chemical speciation in San Francisco Bay, California. Environ. Res. 105, 5–19. doi:10.1016/j.envres.2006.07.006

Budzinski, H., Tapie, N., Magnan, A., Benyahia, M., 2011. Rapport REPAR : Réseau pesticides Bassin d'Arcachon, Action 2 : Quantification de la présence. Résultats des analyses chimiques sur prélèvements ponctuels 2011. 1–23.

Buestel, D., Ropert, D., Prou, J., Gouletquer, P., 2009. History, status, and future of oyster culture in France. J. Shellfish Res. 28, 813–820.

Buisson, S., Bouchart, V., Guerlet, E., Malas, J., Costil, K., 2008. Level of contamination and impact of pesticides in cupped oyster, *Crassostrea gigas*, reared in a shellfish production area in Normandy (France). J. Environ. Sci. Heal. Part B 43, 655–664.

Burnol, A., Duro, L., Grive, M., 2006. Eléments traces métalliques - Guide méthodologique - Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. INERIS 1–119. doi:10.1017/CBO9781107415324.004

Bustamante, P., Luna-Acosta, a., Clemens, S., Cassi, R., Thomas-Guyon, H., Warnau, M., 2012. Bioaccumulation and metabolisation of 14C-pyrene by the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed via seawater. Chemosphere 87, 938–944. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.049

Cairns, J., HEATH, A.G., PARKER, B.C., 1975. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. Hydrobiologia 47, 135–171.

Cajaraville, M., Bebianno, M., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. Sci. Total Environ. 247, 295–311.

Calabrese, A., 1969. Individual and combined effects of salinity and temperature on embryos and larvae of the coot clam, *Mulinia lateralis* (Say). Mar. Biol. Lab. 137, 417–428.

Calabrese, A., Collier, S., Nelson, D. a, Macinnes, J.R., 1973. The Toxicity of Heavy Metals to Embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. Mar. Biol. 66, 162–166. doi:10.1007/BF00367984

Calvet, R., 1989. Adsorption of organic chemicals in soils. Environ. Health Perspect. 83, 145–177. doi:10.1289/ehp.8983145

Campbell, Reece, 2004. La biotechnologie-Chapitre 20, in: Biologie, 2e Edition. p. 1364.

Carbonell, G., Tarazona, J., 1994. Toxicokinetics of copper in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 29, 213–221.

Carriger, J.F., Rand, G.M., 2008. Aquatic risk assessment of pesticides in surface waters in and adjacent to the Everglades and Biscayne National Parks: I. Hazard assessment and problem formulation. Ecotoxicology 17, 660–679. doi:10.1007/s10646-008-0230-0



## Bibliographie

- Castaños, C., Pascual, M., Camacho, A.P., 2009. Reproductive biology of the nonnative oyster, *Crassostrea gigas* (thunberg, 1793), as a key factor for its successful spread along the rocky shores of northern patagonia, argentina. *J. Shellfish Res.* 28, 837–847.
- Chapman, P.M., Long, E.R., 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 14, 81–84. doi:10.1016/0025-326X(83)90305-3
- Chen, M., Yang, H., Delaporte, M., Zhao, S., 2007. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge. *Aquaculture* 271, 479–487. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.051
- Cheng, T., Combes, C., 1990. Influence of environmental factors on the invasion of molluscs by parasites: with special reference to Europe, in: Kluwer Academic Publishers. pp. 307–332.
- Choi, Y.K., Jo, P.G., Choi, C.Y., 2008. Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 147, 286–92. doi:10.1016/j.cbpc.2007.11.002
- Claisse, D., Alzieu, C., 1993. Copper contamination as a result of antifouling paint regulations? *Mar. Pollut. Bull.* 26, 395–397. doi:10.1016/0025-326X(93)90188-P
- Clark, G.M., Goolsby, D.A., Battaglin, W.A., 1999. Seasonal and annual load of herbicides from the Mississippi River basin to the Gulf of Mexico. *Environ. Sci. Technol.* 33, 981–986. doi:10.1021/es980962u
- CNC, 2012. La production française. URL <http://www.cnc-france.com/La-Production-francaise.aspx>
- Cochennec-laureau, N., 2015. Rapport d'activités 2014 Laboratoire Environnement Ressources du Morbihan-Pays de Loire.
- Cochennec-Laureau, N., Baud, J.P., 2011. Bilan des surmortalités des huîtres creuses *Crassostrea gigas* depuis 2008. *Bull. épidémiologique* 42, 2–5.
- Cognie, B., Haure, J., Barillé, L., 2006. Spatial distribution in a temperate coastal ecosystem of the wild stock of the farmed oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 259, 249–259. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.05.037
- Connor, P.M., 1972. Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 3, 190–192.
- Cook, M.E., Moore, P. a., 2008. The effects of the herbicide metolachlor on agonistic behavior in the crayfish, *Orconectes rusticus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 94–102. doi:10.1007/s00244-007-9088-z
- Coquillé, N., Jan, G., Moreira, A., Morin, S., 2015. Use of diatom motility features as endpoints of metolachlor toxicity. *Aquat. Toxicol.* 158, 202–210. doi:10.1016/j.aquatox.2014.11.021
- Cotter, E., Malham, S.K., O'Keefe, S., Lynch, S. a., Latchford, J.W., King, J.W., Beaumont, A.R., Culloty, S.C., 2010a. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of growth, biochemistry and gametogenesis. *Aquaculture* 303, 8–21. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.02.030

## Bibliographie

- Cotter, E., Malham, S.K., O'Keeffe, S., Lynch, S.A., Latchford, J.W., King, J.W., Beaumont, A.R., Culloty, S.C., 2010b. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of growth, biochemistry and gametogenesis. *Aquaculture* 303, 8–21. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.02.030
- Cousins, R., 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* 65, 238–309.
- Crespo, A., 2009. Présence et sources des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le Bassin d'Arcachon 458.
- Cunningham, F.X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K. a, DellaPenna, D., Gantt, E., 1996. Functional analysis of the B and E lycopene cyclase enzymes of arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 8, 1613–1626.
- Czernichowski-Lauriol, I., Caudron, M., 1999. Pollution des eaux souterraines et superficielles par des produits phytosanitaires dans un même bassin hydrogéologique - Application dans le bassin de la Serre, département de l'Aisne. Rap. BRGM R 40615 71.
- Dagens, N., 2012. Réseau Pesticides Bassin d'Arcachon (REPAR) - Rapport d'étude - Les pratiques phytosanitaires agricoles et non agricoles sur le Bassin d'Arcachon 73.
- Dameron, C., Howe, P., 1998. Copper environmental health criteria n°200, World Health Organization. Geneva.
- Damiens, G., His, E., Quiniou, F., Roméo, M., 2004. Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comp. Biochem. Physiol. - Part C Toxicol. Pharmacol.* 138, 121–128.
- Damiens, G., Mouneyrac, C., Quiniou, F., His, E., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., 2006. Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*. *Environ. Pollut.* 140, 492–499. doi:10.1016/j.envpol.2005.08.006
- Davarpanah, E., Guilhermino, L., 2015. Single and combined effects of microplastics and copper on the population growth of the marine microalgae *Tetraselmis chuii*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 167, 269–275. doi:10.1016/j.ecss.2015.07.023
- Depledge, M., 1994. The rationale basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. Non destructive biomarkers in vertebrates, in: FOSSI, M.C., LEONZIO, C., Eds. Lewis Publishers. pp. 271–296.
- Deslous-Paoli, J., 1981. Toxicité des éléments métalliques dissous pour les larves d'organismes marins : données bibliographiques. *Rev. des Trav. 'l Inst. des pêches Marit.* 45, 73–83.
- Devi, M., Thomas, D., Barber, J., Fingerman, M., 1996. Accumulation and physiological and biochemical effects of Cadmium in a simple aquatic food chain. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 38–43.
- Devier, M.-H., 2003. Etude intégrée sur l'impact des différentes classes de contaminants (composés organostanniques, métaux, HAP, PCB) sur les moules. Bioaccumulation et réponses biochimiques.

## Bibliographie

- Di Poi, C., Evariste, L., Serpentini, A., Halm-Lemeille, M.P., Lebel, J.M., Costil, K., 2013. Toxicity of five antidepressant drugs on embryo-larval development and metamorphosis success in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 13302–13314. doi:10.1007/s11356-013-2211-y
- Doney, S.C., Ruckelshaus, M., Emmett Duffy, J., Barry, J.P., Chan, F., English, C. a, Galindo, H.M., Grebmeier, J.M., Hollowed, a B., Knowlton, N., Polovina, J., Rabalais, N.N., Sydeman, W.J., Talley, L.D., 2012. Climate change impacts on marine ecosystems. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 4, 11–37. doi:10.1146/annurev-marine-041911-111611
- Doroudi, M., Southgate, P., Mayer, R., 1999. The combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.). *Aquac. Res.* 30, 271–277.
- Dorsey, A., Ingerman, L., Swarts, S., Corporation, S.R., 2004. Toxicological profile for copper. Agency Toxic Subst. Dis. Regist. Div. Toxicol. Inf. Branch 314.
- Dos Santos, A.E., Nascimento, I.A., 1985. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* guilding, 1828. *Aquaculture* 47, 335–352.
- Du, Y., Zhang, L., Xu, F., Huang, B., Zhang, G., Li, L., 2013. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) development by quantitative real-time PCR. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 939–945. doi:10.1016/j.fsi.2012.12.007
- Dubourg, B., 2012. Les huîtres triploïdes en plein débat. *Sud Ouest*.
- Echeverrigaray, Gomes, Tavares, 1999. Isolation and characterization of Ca<sup>2+</sup>-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 15, 679–681.
- Eisenreich, S.J., JRC, I.I., C. Bernasconi, P. Campostrini, A. De Roo, G. George, A.-S., Heiskanen, J. Hjorth, N. Hoepffner K.C. Jones, P. Noges, N., Pirrone, N. Runnalls, F. Somma, N. Stilanakis, G. Umlauf, W., van de Bund, P. Viaroli, J. Vogt, J.-M.Z., 2005. Climate Change and the European Water Dimension 1–253.
- Ettajani, H., Amiard, J.C., 1995. Biodisponibilité de quelques métaux fixés sur les matières en suspension (MES) en milieu estuarien. *Hydroécologie Appliquée* 7, 75–89. doi:10.1051/hydro:1995005
- FAO, 2005. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Crassostrea gigas*, in: Helm, M.M. (Ed.). FAO, Fisheries and Aquaculture Department, Rome
- FAO, 2010. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture, 2010. Département des pêches l'aquaculture la FAO. Organ. des nations Unies pour l'alimentation l'agriculture Rome, 241 p.
- FAO, 2015. Fisheries and Aquaculture Department. *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). URL [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea\\_gigas/](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/)
- Farcy, E., Fleury, C., Lelong, C., Dubos, M.P., Voiseux, C., Fiévet, B., Lebel, J.M., 2008. Molecular cloning of a new member of the p53 family from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and seasonal pattern of its transcriptional expression level. *Mar. Environ.* 66, 300–308. doi:10.1016/j.marenvres.2008.04.006

## Bibliographie

- Farcy, É., Voiseux, C., Lebel, J.M., Fiévet, B., 2009. Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell Stress Chaperones* 14, 371–380. doi:10.1007/s12192-008-0091-8
- Fauvelle, V., N, M., F, D., K, M., M, E., H., B., 2012. Use of mixed-mode ion exchange sorbent for the passive sampling of organic acids by polar organic chemical integrative sampler (POCIS). *Environ. Sci. Technol.* 46, 13344–53. doi:10.1021/es3035279
- Fitzpatrick, J.L., Nadella, S., Bucking, C., Balshine, S., Wood, C.M., 2008. The relative sensitivity of sperm, eggs and embryos to copper in the blue mussel (*Mytilus trossulus*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 147, 441–9. doi:10.1016/j.cbpc.2008.01.012
- Flemming, C.A., Trevors, J.T., 1989a. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water. Air. Soil Pollut.* doi:10.1007/BF00228784
- Flemming, C.A., Trevors, J.T., 1989b. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water. Air. Soil Pollut.* 44, 143–158.
- Fujiya, M., 1970. Oyster farming in Japan. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 20, 464–479. doi:10.1007/BF01609922
- Gacia, E., Duarte, C.M., 2001. Sediment Retention by a Mediterranean *Posidonia oceanica* Meadow: The Balance between Deposition and Resuspension. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 52, 505–514. doi:DOI: 10.1006/ecss.2000.0753
- Gagnaire, B., Frouin, H., Moreau, K., Thomas-Guyon, H., Renault, T., 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 536–547.
- Galay-Burgos, M., Spurgeon, D.J., Weeks, J.M., Stürzenbaum, S.R., Morgan, a J., Kille, P., 2003. Developing a new method for soil pollution monitoring using molecular genetic biomarkers. *Biomarkers* 8, 229–39. doi:10.1080/354750031000138685
- Galtsoff, P., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fish. Bull.* 64, 480.
- Gamain, P., Agnès Feurtet-Mazel Régine Maury-Brachet Isabelle Auby, A.B.H.B., Daffe, G., Gonzalez, P., 2016a. Experimental ecotoxicological study of the impact of a cocktail of pesticides and copper on the seagrass *Zostera noltei* in the Arcachon bay. En préparation pour *Environ. Sci. Technol.*
- Gamain, P., Cachot, J., Gonzalez, P., Gourves, P.Y., Budzinski, H., Morin, B., 2016b. Do temporal and spatial parameters or lifestyle of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* broodstock native from the Arcachon Bay (Southwest coast of France) affect pollutant bioaccumulation, offspring development and tolerance to pollutants? En préparation pour *Environ. Pollut.*
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Clérendeau, C., Budzinski, H., Mazella, N., Martin, C., Gourves, P.Y., Morin, B., 2016c. Influence of the combined effects of temperature and pollutants on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. En préparation pour *Ecotoxicol.*

## Bibliographie

Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Pardon, P., Tapie, N., Gourves, P.Y., Budzinski, H., Morin, B., 2016d. Combined effects of pollutants and salinity on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 113, 31–38. doi:10.1016/j.marenvres.2015.11.002

Ganthy, F., 2011. Rôle des herbiers de zostères (*Zostera noltii*) sur la dynamique sédimentaire du Bassin d’Arcachon 284.

Gasch, a P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O., 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 11, 4241–4257. doi:10.1091/mbc.11.12.4241

Geffard, O., 2001. Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : évaluation chimique et biologique, biodisponibilités des contaminants sédimentaires.

Geffard, O., Budzinski, H., His, E., 2002. The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of pollutants from sedimentary origin. *Ecotoxicology* 11, 403–416. doi:10.1023/A:1021024415695

Geffard, O., Budzinski, H., LeMenach, K., 2004. " petroleum: Bio-tests applied to petroleum water-accommodated fractions and natural contaminated samples. *Aquat. Living Resour.* 17, 289–296. doi:10.1051/alr

Geracitano, L. a., Luquet, C., Monserrat, J.M., Bianchini, a., 2004. Histological and morphological alterations induced by copper exposure in *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae). *Mar. Environ. Res.* 58, 263–267. doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.069

Gerard, A., Boudry, P., Launav, S., Heurtebise, S., Phelipot, L.E.T.P., 1995. Contrôle de la Gamétogenèse des huîtres creuses et plates . Relations " Reproduction " Et " Génétique ."

Gervais, O., Renault, T., Arzul, I., 2015. Induction of apoptosis by UV in the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 232–242. doi:10.1016/j.fsi.2015.05.046

Gieskes, J.M., Han, S., Rathburn, A., Rothwell, G., Pérez, M.E., Porrachia, M., Barbanti, A., Deheyn, D.D., 2015. Anthropogenic contaminants in Venice Lagoon sediments and their pore fluids: Results from the SIOSED Project. *Mar. Chem.* 174, 73–84. doi:10.1016/j.marchem.2015.05.008

Gilliom, R.J., 2007. Pesticides in U.S. streams and groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3408–3414. doi:10.1021/es072531u

Goberville, E., Beaugrand, G., Sautour, B., Tréguer, P., 2010. Climate-driven changes in coastal marine systems of western Europe. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 408, 129–147. doi:10.3354/meps08564

Gomiero, A., Viarengo, A., 2014. Effects of elevated temperature on the toxicity of copper and oxytetracycline in the marine model, *Euplotes crassus*: A climate change perspective. *Environ. Pollut.* 194, 262–271.

Greenwood, P., 1981. Some effects of temperature-salinity combinations on the early development of the sea urchin *Parechinus angulosus* (Leske). *Fertilization. J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 51, 119–131.

## Bibliographie

Groisman, P.Y., Karl, T.R., Easterling, D.R., Knight, R.W., Jamason, P.F., Hennessy, K.J., Suppiah, R., Page, C.M., Wibig, J., Fortuniak, K.V.N., Douglas, A., Førland, E., Zhai, P.-M., 1999. Change in the probability of heavy precipitation : important indicators of climatic change. *Clim. Change* 42, 243–283.

Guimaraes, A., Linden, R., 2004. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.* 271, 1638–1650. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04084.x

Gunkel, G., Streit, B., 1980. Mechanisms of bioaccumulation of herbicide (atrazine, s-triazine) in a freshwater mollusc (*Ancylus fluviatilis mull.*) and a fish (*Coregonus fera jurine*). *Water Res.* 14, 1573–1584.

Hadfield, M.G., 2000. Why and how marine-invertebrate larvae metamorphose so fast. *CELL Dev. Biol.* 11, 437–443. doi:10.1006/scdb.2000.0197

Hamdoun, A.M., Cheney, D.P., Cherr, G.N., 2003a. Phenotypic Plasticity of HSP70 and HSP70 Gene Expression in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*): Implications for Thermal Limits and Induction of Thermal Tolerance. *Biol. Bull.* 205, 160–169.

Hamdoun, A.M., Cheney, D.P., Cherr, G.N., Box, P.O., Bay, B., Ave, S., Toxicology, E., Davis, C., 2003b. Phenotypic Plasticity of HSP70 and HSP70 Gene Expression in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*): Implications for Thermal Limits and Induction of Thermal Tolerance 160 –169. doi:10.2307/1543236

Hartmann, D.J., Klein Tank, A.M.G., Rusticucci, M., Alexander, L. V, Brönnimann, S., Charabi, Y.A.-R., Dentener, F.J., Dlugokencky, E.J., Easterling, D.R., Kaplan, A., Soden, B.J., Thorne, P.W., Wild, M., Zhai, P., 2013. Observations: Atmosphere and Surface. *Clim. Chang. 2013 Phys. Sci. Basis. Contrib. Work. Gr. I to Fifth Assess. Rep. Intergov. Panel Clim. Chang.* 159–254. doi:10.1017/CBO9781107415324.008

Helm, M.M., Millican, P.F., 1977. Experiments in the hatchery rearing of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 11, 1–12.

Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry : role of free radicals, *Rhinology. Supplement.* doi:10.1159/0003199858

Heugens, E.H.W., Jager, T., Creyghton, R., Kraak, M.H.S., Hendriks, a. J., Van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2003. Temperature-dependent effects of cadmium on daphnia magna: Accumulation versus sensitivity. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2145–2151. doi:10.1021/es0264347

His, E., 1976. La detection des pontes dans le milieu naturel : application de l'ostréographie a l'etude de la reproduction des huîtres. *Haliotis* 5, 10.

His, E., 1991. Biologie et écotoxicologie des végétales de *Crassostrea gigas* (Thunberg) dans le Bassin d'Arcachon.

His, E., Beiras, R., Quiniou, F., Parr, A.C.S., Smith, M.J., Cowling, M.J., Hodgkiess, T., 1996. The non-toxic effects of a novel antifouling material on oyster culture. *Water Res.* 30, 2822–2825.

His, E., Beiras, R., Silhouette, C., 1997. A Simplification the Bivalve Embryogenesis and Larval Development Bioassay Method for Water Quality Assessment. *Water. Res* 31, 351–355. doi:10.1016/S0043-1354(96)00244-8

## Bibliographie

His, E., Heyvang, I., Geffard, O., De Montaudouin, X., 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Res.* 33, 1706–1718. doi:10.1016/S0043-1354(98)00381-9

His, E., Robert, R., 1982. Le danger des traitements par le sulfate de cuivre en zone conchylicole : toxicité vis-à-vis des oeufs et des jeunes larves de *Crassostrea gigas*. *Rev. des Trav. l'Institut des Pêches Marit.* 45, 117–125.

His, E., Robert, R., Dinét, A., 1989a. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*.

His, E., Robert, R., Dinét, A., 1989b. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 100, 455–463.

His, E., Seaman, M., 1993. Effects of twelve pesticides on larvae of oysters (*Crassostrea gigas*) and on two species of unicellular marine algae (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*). *ICES Mar. Environ. Qual. Comm.* 8.

Hodson, P., Borgmann, U., Shear, H., 1979. Copper in the environment: Part 2 Health Effects, in: J. O. Nriagu, Ed., John Wiley & Sons Ltd, Toronto. pp. 307–372.

Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P.J., Hooten, A.J., Steneck, R.S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C.D., Sale, P.F., Edwards, A.J., Caldeira, K., Knowlton, N., Eakin, C.M., Iglesias-Prieto, R., Muthiga, N., Bradbury, R.H., Dubi, A., Hatziolo, M.E., 2007. Coral reefs under rapid climate change and Ocean Acidification. *Sci. mag* 318, 1737–1742.

Hollows, C., Johnston, E., Marshall, D., 2007. Copper reduces fertilization success and exacerbates Allee effects in the field. *Mar. Pollut. Bull.* 333, 51–60.

Holmstrup, M., Bindesbøl, A.-M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.-R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Ferreira, A.L.G., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P.E., Bayley, M., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Sci. Total Environ.* 408, 3746–3762. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.10.067

Horiguchi, T., Imai, T., Cho, H.S., Shiraishi, H., Shibata, Y., Morita, M., Shimizu, M., 1998. Acute toxicity of organotin compounds to the larvae of the rock shell, *Thais clavigera*, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the giant abalone, *Haliotis madaka*. *Mar. Environ. Res.* 46, 469–473. doi:10.1016/S0141-1136(97)00058-5

Hrs-Brenko, M., 1981. The growth and survival of larvae of several bivalve species at high temperatures and the practicability of their culture in heated effluent waters. *Acta Biol. Iugosl. Ichthyol.* 13, 29–37.

Hrs-Brenko, M., Calabrese, A., 1969. The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 4, 224–226.

## Bibliographie

Hrs-Brenko, M., Claus, C., Bubic, S., 1977. Synergistic effects of lead, salinity and temperature on embryonic development of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biol.* 44, 109–115. doi:10.1007/BF00386951

Hung, T.-C., Meng, P.-J., Han, B.-C., Chuang, A., Huang, C.-C., 2001. Trace metals in different species of mollusca, water and sediments from Taiwan coastal area. *Chemosphere* 44, 833–841.

Ifremer, 2008. Impact potentiel des activités nautiques sur la qualité des eaux du Bassin d' Arcachon. IFREMER 35.

Ifremer, 2009. Fiche d' information Ifremer - Les huîtres triploïdes - Fiche Aquaculture du 27 novembre 2009.

Ifremer, 2014. Qualité du Milieu Marin Littoral - Bulletin de la surveillance - Edition 2014 131.

Ifremer, 2015. La pêche à Arcachon - Ressources vivantes. URL [http://wwz.ifremer.fr/laboratoire\\_arcachon/Environnement-et-ressources-vivantes/Ressources-vivantes/La-peche-a-Arcachon](http://wwz.ifremer.fr/laboratoire_arcachon/Environnement-et-ressources-vivantes/Ressources-vivantes/La-peche-a-Arcachon)

Inserm, 2015. Génétique, génomique et bioinformatique - Dossier d'information : Epigénétique. URL <http://www.inserm.fr/thematiques/genetique-genomique-et-bioinformatique/dossiers-d-information/epigenetique>

IPCC, 2013. Working group I contribution to the IPCC fifth assessment report climate change 2013 : The physical science basis final draft underlying scientific-technical assessment.

Jones, C.G., Lawron, J.H., Shachak, M., 1997. Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology* 78, 1946–1957. doi:10.1890/0012-9658(1997)078[1946:PANEOO]2.0.CO;2

Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M., 1994. Organisms as Ecosystem Engineers Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69, 373–386.

Kegley, S.E., Hill, B.R., Orme, S., Choi, A.H., 2011. PAN—Pesticide Database. Pesticide Action Network, North America, San Francisco, CA, [\\_http://www.pesticideinfo.org\\_](http://www.pesticideinfo.org).

Kinne, 1964. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals. II. Salinity and temperature-salinity combinations. *Ocean. Mar. Biol. Annu. Rev.* 2, 281–339.

Ko, G.W.K., Dineshram, R., Campanati, C., Vera, C.B.S., Havenhand, J., Thiyagarajan, V., 2014. Interactive Effects of Ocean Acidification, Elevated Temperature and Reduced Salinity on Early-Life Stages of the Pacific Oyster. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10079–10088. doi:10.1021/es501611u

Kroeker, K.J., Kordas, R.L., Crim, R., Hendriks, I.E., Ramajo, L., Singh, G.S., Duarte, C.M., Gattuso, J.P., 2013. Impacts of ocean acidification on marine organisms: Quantifying sensitivities and interaction with warming. *Glob. Chang. Biol.* 19, 1884–1896. doi:10.1111/gcb.12179

Kroeker, K.J., Kordas, R.L., Crim, R.N., Singh, G.G., 2010. Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecol. Lett.* 13( 11), 1419–1434.



## Bibliographie

- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R., 2008. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* (80-. ). 319, 1827–1830. doi:10.1126/science.1153069
- Kumar, a., Correll, R., Grocke, S., Bajet, C., 2010. Toxicity of selected pesticides to freshwater shrimp, *Paratya australiensis* (Decapoda: Atyidae): Use of time series acute toxicity data to predict chronic lethality. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 360–369. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.09.001
- Kurihara, H., Kato, S., Ishimatsu, A., 2007. Effects of increased seawater pCO<sub>2</sub> on early development of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquat. Biol.* 1, 91–98. doi:10.3354/ab00009
- Lahman, S.E., Trent, K.R., Moore, P. a., 2015. Sublethal copper toxicity impairs chemical orientation in the crayfish, *Orconectes rusticus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 369–377. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.12.022
- Lannig, G., Flores, J.F., Sokolova, I.M., 2006. Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: Pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquat. Toxicol.* 79, 278–287.
- Lauenstein, G.G., 1995. Comparison of organic contaminants found in mussels and oysters from a current mussel watch project with those from archived mollusc samples of the 1970s. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 826–833. doi:10.1016/0025-326X(95)00089-6
- Le Berre, I., Hily, C., Lejart, M., Gouill, R., 2009. Analyse spatiale de la prolifération de *C. gigas* en Bretagne. *Cybergeog. Eur. J. Geogr. Environnement, Nature, Paysage*,. doi:10.4000/cybergeog.22818
- Le Berre, S., Courtel, J., Brigand, L., 2010. Etude de la fréquentation nautique du Bassin d’Arcachon - Rapport final. Dir. régionale des Aff. Marit. Aquitaine – Serv. Départemental Arcachon Géomer, Umr 6554 LETG – Univ. Bretagne Occident. 102.
- Legendre, Legendre, 1998. Numerical ecology. Transformation 1–4.
- Legoff, F., Bonnomet, V., 2004. Devenir et comportement des métaux dans l’ eau : biodisponibilité et modèles BLM Rapport technique Devenir et comportement des métaux dans l’ eau : biodisponibilité et modèles BLM Rapport technique. INERIS 87.
- Lehotay, S.J., Harman-fetcho, J.A., Mcconnell, L.L., 1998. Agricultural Pesticide Residues in Oysters and Water from Two Chesapeake Bay Tributaries 37, 32–44.
- Lejart, M., 2009. Etude du processus invasif de *Crassostrea gigas* en Bretagne : Etat des lieux, dynamique et conséquences écologiques.
- Leverett, D., Thain, J., 2013. Oyster embryo-larval bioassay ( revised ), in: ICES TECHNIQUES IN MARINE ENVIRONMENTAL SCIENCES. p. 38.
- Lewbart, G.A., 2011. No Title, in: Invertebrate Medicine, 2nd Edition. p. 504.
- Liang Liang, Z., Hun Kim, Y., Feng Zhang, Z., Min Lim, S., Ho Kang, K., 2009. Water temperature and salinity tolerance of embryos and spat of the mussel, *Musculista senhousia*. *Korean J.Malacol.* 25, 179–187.

## Bibliographie

- Lin, H., Hsu, S., Hwang, P.P., 2000. Maternal transfer of cadmium tolerance in larval *Oreochromis mossambicus*. *J. Fish Biol.* 57, 239–249.
- Lindquist, S., Craig, E.A., 1988. The heat-shock proteins.
- Littaye, A., Dantas, M., Hubert, R., 2011. Projet de parc naturel marin sur le bassin d'Arcachon et son ouvert. Agence des aires Mar. protégées 152.
- Liu, H., Xiong, M., 2009. Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metolachlor to *Chlorella pyrenoidosa*. *Aquat. Toxicol.* 93, 100–106. doi:10.1016/j.aquatox.2009.04.006
- Liu, H., Ye, W., Zhan, X., Liu, W., 2006. A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 451–455. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.02.002
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lough, R., Gonor, J., 1971. Early embryonic stages of *Adula californiensis* (Pelecypoda : Mytilidae) and the effect of temperature and salinity on developmental rate. *Mar. Biol.* 8, 118–125.
- Loureiro, S., Newton, A., Icely, J., 2006. Boundary conditions for the European Water Framework Directive in the Ria Formosa lagoon, Portugal (physico-chemical and phytoplankton quality elements). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 67, 382–398. doi:10.1016/j.ecss.2005.11.029
- Lucas, C.H., Horton, A.A., 2014. Short-term effects of the heavy metals, Silver and copper, on polyps of the common jellyfish, *Aurelia aurita*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 461, 154–161. doi:10.1016/j.jembe.2014.08.003
- Luna-acosta, A., Renault, T., Thomas-guyon, H., Faury, N., Saulnier, D., Budzinski, H., 2012. Chemosphere Detection of early effects of a single herbicide ( diuron ) and a mix of herbicides and pharmaceuticals ( diuron , isoproturon , ibuprofen ) on immunological parameters of Pacific oyster ( *Crassostrea gigas* ) spat. *Chemosphere* 87, 1335–1340. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.02.022
- Luo, L., Ke, C., Guo, X., Shi, B., Huang, M., 2014. Metal accumulation and differentially expressed proteins in gill of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) exposed to long-term heavy metal-contaminated estuary. *Fish Shellfish Immunol.* 38, 318–329. doi:10.1016/j.fsi.2014.03.029
- MacInnes, J.R., Calabrese, a., 1979. Combined effects of salinity, temperature, and copper on embryos and early larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 8, 553–562. doi:10.1007/BF01055036
- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H., Morin, B., 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2663–2670. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.10.009
- Mai, H., Gonzalez, P., Pardon, P., Tapie, N., Budzinski, H., Cachot, J., Morin, B., 2014. Comparative responses of sperm cells and embryos of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to exposure to metolachlor and its degradation products. *Aquat. Toxicol.* 147, 48–56. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.024

## Bibliographie

- Mai, H., Morin, B., Pardon, P., Gonzalez, P., Budzinski, H., Cachot, J., 2013. Environmental concentrations of irgarol, diuron and S-metolachlor induce deleterious effects on gametes and embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 89, 1–8. doi:10.1016/j.marenvres.2013.04.003
- Maniez, C., Laug, M., 2009. Captage du CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère, Ecole des Mines Douai.
- Manzo, S., Miglietta, M.L., Rametta, G., Buono, S., Di Francia, G., 2013. Embryotoxicity and spermotoxicity of nanosized ZnO for Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*. *J. Hazard. Mater.* 254-255, 1–7. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.03.027
- Mao, H., Wang, D.H., Yang, W.X., 2012a. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquat. Toxicol.* 110-111, 208–213. doi:10.1016/j.aquatox.2012.01.018
- Mao, H., Wang, D.-H., Yang, W.-X., 2012b. The involvement of metallothionein in the development of aquatic invertebrate. *Aquat. Toxicol.* 110-111, 208–213. doi:10.1016/j.aquatox.2012.01.018
- Marchand, M., Amouroux, I., Bédier, E., Belin, C., Claisse, D., Durand, G., Soudant, D., 2015. Qualité du Milieu Marin Littoral Synthèse Nationale de la Surveillance 2013- Edition 2015 1–60.
- Marie, V., Baudrimont, M., Boudou, A., 2006. Cadmium and zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65, 609–617. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.01.074
- Marshall, D., 2008. Transgenerational plasticity in the sea: context-dependent maternal effects across the life history. *Ecology* 89, 418–427.
- Martin, M., Osborn, K.E., Billig, P., Glickstein, N., 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 12, 305–308. doi:10.1016/0025-326X(81)90081-3
- Mason, R.P., 2013. Trace metals and organisms: Essential and toxic metals, organometallics, microbial processes, and metal bioaccumulation, in: *Trace Metals in Aquatic Systems*. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, UK. pp. 370–421. doi:10.1002/9781118274576
- Maurer, D., Auby, I., Moran, A., Barbier, C., Perrière-rumèbe, M., Tournaire, M.-P., Isabelle, A., Connes, C., 2011. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon - Année 2011. Ifremer (LER AR). 61.
- Maurer, D., Auby, I., Passoni, S., Méteigner, C., Rigouin, L., Perrière-Rumèbe, M., Tournaire, M.-P., 2013. Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon Année 2013. Ifremer 60.
- May, P., May, E., 1999. Rôles de P53 dans le cycle cellulaire, l'apoptose et le cancer. *Rev. Française des Lab.* 342, 41–48. doi:10.1016/S0338-9898(99)80035-3
- Meresse, M., Frostin, G., 2012. Quel avenir pour la filière ostréicole dans les régions de la façade atlantique française ? *Cons. Econ. sociaux environnementaux l'Atlantique* 54.
- Mermet-Bouvier, C., 2006. Caractérisation d'un nouveau récepteur à dépendance : TrkC et étude de la signification biologique de la fonction pro-apoptotique de RET dans la tumorigenèse.

## Bibliographie

- Mileikovsky, S. a., 1973. Speed of active movement of pelagic larvae of marine bottom invertebrates and their ability to regulate their vertical position. *Mar. Biol.* 23, 11–17. doi:10.1007/BF00394107
- Mille, D., Le Moine, O., 2011. Adaptabilités des activités conchylicoles aux modifications de leur environnement : Scénarii et solutions. Le cas du bassin de Marennes-Oléron.
- Miossec, L., Deuff, R.-M. LE, Gouletquer, P., 2009. Alien species alert : *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). ICES Coop. Res. Rep. 46.
- Moal, J., Lambert, C., Moullac, G. Le, Moal, J., Lambert, C., Moullac, G. 2010. Le facteur de risque température.
- Mori, K., 1979. Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 53, 361–369. doi:10.1007/BF00391619
- Mori, R., Wang, Q., Danenberg, K.D., Pinski, J.K., Danenberg, P. V., 2008. Both  $\beta$ -actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate* 68, 1555–1560. doi:10.1002/pros.20815
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Dubreule, C., Serpentine, A., Lebel, J.M., Costil, K., 2014. Effects of acute exposures to mecoprop, mecoprop-p and their biodegradation product (2-MCP) on the larval stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 146, 165–175. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.008
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpentine, A., Lebel, J.M., Jha, A.N., Costil, K., 2013. Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the *Pacific oyster*, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* 128-129, 67–78. doi:10.1016/j.aquatox.2012.12.002
- Mottin, E., Caplat, C., Latire, T., Mottier, A., Mahaut, M.L., Costil, K., Barillier, D., Lebel, J.M., Serpentine, A., 2012. Effect of zinc sacrificial anode degradation on the defence system of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Chronic and acute exposures. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 1911–1920. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.06.017
- Muñoz, I., Rosés, N., 2000. Comparison of extraction methods for the determination of atrazine accumulation in freshwater molluscs (*Physa acuta* Drap. and *Ancylus fluviatilis* Müll, Gastropoda). *Water Res.* 34, 2846–2848. doi:10.1016/S0043-1354(99)00394-2
- Nadella, S.R., Fitzpatrick, J.L., Franklin, N., Bucking, C., Smith, S., Wood, C.M., 2009. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossolus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 340–348. doi:10.1016/j.cbpc.2008.09.001
- Neves, M., Castro, B.B., Vidal, T., Vieira, R., Marques, J.C., Coutinho, J. a. P., Gonçalves, F., Gonçalves, a. M.M., 2015. Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecol. Indic.* 53, 220–230. doi:10.1016/j.ecolind.2015.01.031

## Bibliographie

- Newton, a., Icely, J.D., Falcao, M., Nobre, a., Nunes, J.P., Ferreira, J.G., Vale, C., 2003. Evaluation of eutrophication in the Ria Formosa coastal lagoon, Portugal. *Cont. Shelf Res.* 23, 1945–1961. doi:10.1016/j.csr.2003.06.008
- O’Connell, P.J., Harms, C.T., Allen, J.R.F., 1998. Metolachlor, S-metolachlor and their role within sustainable weed-management. *Crop Prot.* 17, 207–212. doi:10.1016/S0261-2194(98)80011-2
- O’Connor, W.A., Lawler, N.F., 2004a. Salinity and temperature tolerance of embryos and juveniles of the pearl oyster, *Pinctada imbricata Röding*. *Aquaculture* 229, 493–506. doi:10.1016/S0044-8486(03)00400-9
- O’Connor, W.A., Lawler, N.F., 2004b. Salinity and temperature tolerance of embryos and juveniles of the pearl oyster, *Pinctada imbricata* Ro. *Aquaculture* 229, 493–506. doi:10.1016/S0044-8486(03)00400-9
- Of, S., Thesis, T.H.E., 2013. THESIS.
- Okamura, H., Aoyama, I., Liu, D., Maguire, R., Pacepavicius, G., Lau, Y., 2000. Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. *Water Res.* 34, 3523–3530.
- OMS IPCS, 1998. Environmental Health Criteria n°200: copper. World Health Organisation, International Programme on chemical Safety. <http://www.inchem.org/fullist.htm>.
- ONML, 2015. Population présente toute l'année dans les départements littoraux métropolitains. URL <http://www.onml.fr>
- Orth, R.J., Carruthers, T.I.M.J.B., Dennison, W.C., Duarte, C.M., James, W., Jr, K.L.H., Hughes, A.R., Kendrick, G.A., Kenworthy, W.J., Olyarnik, S., Short, F.T., Waycott, M., Williams, S.L., 2006. Global Crisis for Seagrass Ecosystems - Done. *Bioscience* 56, 987–996.
- Ozoh, P.T., 1992. The effect of temperature and salinity on copper body-burden and copper toxicity to *Hediste (Nereis) diversicolor*. *Environ. Monit. Assess.* 21, 11–17.
- Park, M.S., Jo, P.G., Choi, Y.K., An, K.W., Choi, C.Y., 2009. Characterization and mRNA expression of Mn-SOD and physiological responses to stresses in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol. Res.* 5, 451–461. doi:10.1080/17451000802626554
- Parker, L.M., Ross, P.M., O’Connor, W. a., 2010. Comparing the effect of elevated pCO<sub>2</sub> and temperature on the fertilization and early development of two species of oysters. *Mar. Biol.* 157, 2435–2452. doi:10.1007/s00227-010-1508-3
- Peake, E., Locke, J., Tierney, L., Kolok, A., 2004. Copper tolerance in fatheadminnows: II. Maternal transfer. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 208–211.
- Perdue, J.A., Beattie, J.H., Chew, K.K., 1981. Some relationships between Gametogenic Cycle and Summer Mortality Phenomenon in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) in Washington State. *J. Shellfish Res.* 1, 9–16.
- Pernet, F., Barret, J., Le Gail, P., Malet, N., Pastoureaux, a, Munaron, D., De Lorgeril, J., Bachère, E., Vaquer, a, Huvet, a, Corporeau, C., Normand, J., Boudry, P., Moal, J., Quéré, C., Quilien, V., Daniel, J.,

## Bibliographie

Pépin, J., Saulnier, D., Gonzalez, J., Bouchouca, M., 2010. Mortalité du naissain d’Huître creuse *Crassostrea gigas* dans l’étang de Thau en 2009 96.

Pernet, F., Barret, J., Le Gall, P., Franck, L., Fiandrino, A., Huvet, A., Cordporeau, C., Boudry, P., Quéré, C., Dégremont, L., 2011. Mortalités massives de l’Huître creuse : causes et perspectives Rapport final du programme de recherche sur les mortalités d ’ huîtres creuses *Crassostrea gigas* dans l ’ étang de Thau.

Pesando, D., Robert, S., Huitorel, P., Gutknecht, E., Pereira, L., Girard, J.P., Ciapa, B., 2004. Effects of methoxychlor, dieldrin and lindane on sea urchin fertilization and early development. *Aquat. Toxicol.* 66, 225–239. doi:10.1016/j.aquatox.2003.09.007

Peyrefitte, M., 1993. La dynamique spatio-économique du Bassin d’Arcachon. IFREMER 1–10. doi:10.1017/CBO9781107415324.004

Piano, A., Asirelli, C., Caselli, F., Fabbri, E., 2002. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress Chaperones* 7, 250–257. doi:10.1379/1466-1268(2002)007<0250:HEITSO>2.0.CO;2

Piquet, J.-C., 2014. DOCUMENT DE PRESCRIPTION « SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE » INVENTAIRE CARTOGRAPHIQUE DES POINTS DE PRELEVEMENT REMI ET DES LISTES DE ZONES CLASSEES ET SURVEILLEES 33.

Plus, M., Dumas, F., Stanisière, J.-Y., Maurer, D., 2009. Hydrodynamic characterization of the Arcachon Bay, using model-derived descriptors. *Cont. Shelf Res.* 29, 1008–1013. doi:10.1016/j.csr.2008.12.016

Plus, M., Maurer, D., Dumas, F., 2006. Caractérisation des composantes hydrodynamiques d ’ une lagune mésotidale , le Bassin d ’ Arcachon . PNEC – Chantier Littoral Atlantique : Mode de fonctionnement des systèmes semi-fermés du littoral Atlantique Thème 1 : Caractérisation des forçages hydrod. IFREMER 54.

Pörtner, H.-O., Reipschlag, a, Heisler, N., 1998. Acid-base regulation, metabolism and energetics in *Sipunculus nudus* as a function of ambient carbon dioxide level. *J. Exp. Biol.* 201, 43–55.

Pouvreau, S., Gangnery, A., Tiapari, J., Lagarde, F., Garnier, M., Boday, A., 2000. Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteriidae), cultivated in Takapoto atoll (French Polynesia). *Aquat. Living Resour.* 13, 37–48. doi:10.1016/S0990-7440(00)00135-2

Pouvreau, S., Lepennec, M., 2006. Ecophysiologie de la reproduction chez l’huître creuse *Crassostrea gigas*.

Przeslawski, R., Byrne, M., Mellin, C., 2015. A review and meta-analysis of the effects of multiple abiotic stressors on marine embryos and larvae. *Glob. Chang. Biol.* 21, 2122–2140. doi:10.1111/gcb.12833

Quiniou, F., Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Geffard, a, Mouneyrac, C., Budzinski, H., Romeo, M., 2007. Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. *Env. Int* 33, 27–33. doi:S0160-4120(06)00097-3 [pii] 10.1016/j.envint.2006.06.020

## Bibliographie

- Quiniou, F., His, E., Delesmont, R., Caisey, X., 2005. Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux: bio-essai "développement embryon-lavaire de bivalve," Méthodes d'analyse en milieu marin.
- Quiniou, F., Toularastel, F., LeFevre-Lehoerff, G., 1991. Utilisation des bioessais sur les embryons de bivalves dans le cadre d'une surveillance des effets biologiques. IFREMER 22.
- Ramachandran, S., Patel, T.R., Colbo, M.H., 1997. Effect of copper and cadmium on three Malaysian tropical estuarine invertebrate larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 36, 183–188. doi:10.1006/eesa.1996.1508
- Range, P., Pilo, D., Ben-Hamadou, R., Chicharo, M., Matias, D., Joaquim, S., Oliveira, A., Chicharo, L., 2012. Seawater acidification by CO<sub>2</sub> in a coastal lagoon environment: Effects on life history traits of juvenile mussels *Mytilus galloprovincialis*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 424, 89–98.
- Rice, C.P., Nochetto, C.B., Zara, P., 2002. Volatilization of Trifluralin, Atrazine, Metolachlor, Chlorpyrifos,  $\alpha$ -Endosulfan, and  $\beta$ -Endosulfan from Freshly Tilled Soil. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4009–4017.
- Richardson, B.J., Mak, E., De Luca-Abbott, S.B., Martin, M., McClellan, K., Lam, P.K.S., 2008. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels "integrate" biomarker responses? *Mar. Pollut. Bull.* 57, 503–514. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.02.032
- Ringwood, A.H., 1992. Comparative sensitivity of gametes and early developmental stages of a sea urchin species (*Echinometra mathaei*) and a bivalve species (*Isognomon californicum*) during metal exposures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 288–295. doi:10.1007/BF00212088
- Ringwood, A.H., Brouwer, M., 1995. Patterns of metallothionein expression in oyster embryos. *Mar. Environ. Res.* 39, 101–105. doi:10.1016/0141-1136(94)00042-N
- Rivard, L., 2003. Environmental Fate of Metolachlor. *Environ. Monit. Branch Dep. Pestic. Regul.* 14.
- Robert, R., His, E., 1981. Action de 1,1-acétate de tributyle-étain sur les oeufs et les larves D de deux mollusques d'intérêt commercial : *Crassostrea Rigas* (Thunberg) et *Hytilus galloprovincialis* (Lmk). *Com. la Maric.* 42, 1–16.
- Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals 22.
- Rollin, C., Quiot, F., 2006. Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines, Rapport INERIS-DRC. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Ruesink, J.L., Hunter, S.L., Trimble, A.C., KimberlyW. Heiman, FiorenzaMicheli, J.E.B., Kay, and M.C., 2005. INTRODUCTION OF NON-NATIVE OYSTERS: Ecosystem Effects and Restoration Implications.
- Ruttkey-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R., 2013. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6044–6066. doi:10.3390/ijms14036044

## Bibliographie

- Salvo, F., 2010. Approche comparée des populations naturelles et cultivées d'huître japonaise *Crassostrea gigas* dans une lagune macro-tidale (Bassin d'Arcachon) : cycle biologique, relations trophiques et effets sur le benthos 4, 510.
- Schroeder, H. a, Nason, a P., Tipton, I.H., Balassa, J.J., 1966. Essential trace metals in man: copper. J. Chronic Dis. 19, 1007–1034. doi:10.1016/0021-9681(70)90056-1
- Scourzic, T., Loyen, M., Fabre, E., Tessier, A., Dalias, N., Trut, G., Maurer, D., Simonnet, B., 2011. Evaluation du stock d'huîtres sauvages et en élevage dans le Bassin d'Arcachon.
- Shi, Y., 2002. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. Mol. Cell 9, 459–470. doi:10.1016/S1097-2765(02)00482-3
- Shine, J.P., Wallace, G.T., 1995. the Formation of Surface-Active Organic-Complexes of Copper in Coastal Marine Waters. Mar. Chem. 51, 145–157. doi:10.1016/0304-4203(95)00050-2
- SIBA, 2013. Rapport annuel 2013 sur le prix et la qualité des services publics de l'assainissement collectif et non collectif 112.
- Schéma de mise en valeur de la mer du Bassin d'ARCACHON, 2004. Rapport de présentation. 129 p.
- SOMLIT, 2015. Service d'observation en milieu littoral. URL somlit.epoc.u-bordeaux1.fr/
- Song, Y.P., Suquet, M., Quéau, I., Lebrun, L., 2009. Setting of a procedure for experimental fertilisation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. Aquaculture 287, 311–314. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.018
- Srinivasan, M., Swain, G.W., 2007. Managing the Use of Copper-Based Antifouling Paints. Environ. Manage. 39, 423–441. doi:10.1007/s00267-005-0030-8
- Suquet, M., Amourda, C., Mingant, C., Quéau, I., Lebrun, L., Brizard, R., 2007. Setting of a procedure for experimental incubation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. Aquaculture 273, 503–508. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.018
- Suquet, M., Mercier, A. Le, Rimond, F., Mingant, C., Haffray, P., Labbe, C., Iroise, T.B., 2012. Setting tools for the early assessment of the quality of thawed Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) D-larvae. Theriogenology 78, 462–467.
- Suquet, M., Rimond, F., Cosson, J., Wilson-Leedy, J., Lebrun, L., Queau, I., Mingant, C., Fauvel, C., 2013. Effect of age and environmental conditions on the movement characteristics of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) trochophores. J. Appl. Ichthyol. 29, 1145–1148.
- Tagu, D., Moussard, C., 2003. Principes des techniques de biologie moléculaire, in: Principes Des Techniques de Biologie Moléculaire. p. 176.
- Tettlebach, S.T., Rhodes, E.W., 1981. Combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the Northern Bay scallop *Argopecten irradians irradians*. Mar. Biol. 63, 249–256.



## Bibliographie

- Thakkar, M., Randhawa, V., Wei, L., 2013. Comparative responses of two species of marine phytoplankton to metolachlor exposure. *Aquat. Toxicol.* 126, 198–206. doi:10.1016/j.aquatox.2012.10.002
- Thiyagarajan, V., Ko, G.W.K., 2012. Larval growth response of the Portuguese oyster (*Crassostrea angulata*) to multiple climate change stressors. *Aquaculture* 370-371, 90–95. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.09.025
- Thomas-Guyon, H., Gagnaire, B., Bado-Nilles, A., Bouilly, K., Lapègue, S., Renault, T., 2009. Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Dev. Comp. Immunol.* 33, 653–659. doi:10.1016/j.dci.2008.11.011
- Trenkamp, S., Martin, W., Tietjen, K., 2004. Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty acid elongases from *Arabidopsis thaliana* by different herbicides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11903–11908. doi:10.1073/pnas.0404600101
- Turner, A., 2010. Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 159–171. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.12.004
- Untersee, S., Pechenik, J.A., 2007. Local adaptation and maternal effects in twospecies of marine gastropod (*Crepidula*) that differ in dispersal potential. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 347, 79–85.
- Van der Werf, H.M.G., 1996. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agric. Ecosyst. Environ.* 60, 81–96.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, 1–12. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Ventura-Lima, J., Sandrini, J.Z., Cravo, M.F., Piedras, F.R., Moraes, T.B., Fattorini, D., Notti, A., Regoli, F., Geracitano, L. a., Marins, L.F.F., Monserrat, J.M., 2007. Toxicological responses in *Laeonereis acuta* (annelida, polychaeta) after arsenic exposure. *Environ. Int.* 33, 559–564. doi:10.1016/j.envint.2006.09.016
- Verkhovskiy, M.I., Belevich, I., Bloch, D. a., Wikström, M., 2006. Elementary steps of proton translocation in the catalytic cycle of cytochrome oxidase. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1757, 401–407. doi:10.1016/j.bbabi.2006.05.026
- Verween, a., Vincx, M., Degraer, S., 2007. The effect of temperature and salinity on the survival of *Mytilopsis leucophaeata* larvae (*Mollusca, Bivalvia*): The search for environmental limits. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 348, 111–120. doi:10.1016/j.jembe.2007.04.011
- Viarengo, A., Accomando, R., Ferrando, I., Beltrame, F., Fato, M., Marcenaro, G., 1996. Heavy metal effects on cytosolic free Ca<sup>2+</sup> level in the marine protozoan *Euplotes crassus* evaluated by confocal laser scanning microscopy. *Comp. Biochem. Physiol. C-Pharmacology Toxicol. Endocrinol.* 113, 161–168.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel

## Bibliographie

organisms. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 146, 281–300. doi:10.1016/j.cbpc.2007.04.011

Waddington, C., 1942. Canalisation of development and the inheritance of acquired characters. *Group* 563–565.

Waeles, M., Riso, R.D., Cabon, J.Y., Maguer, J.F., & Helguen, S., 2009. Speciation of dissolved copper and cadmium in the Loire estuary and over the North Biscay continental shelf in spring. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84, 139–146. doi:10.1016/j.ecss.2009.06.011

Ward, L.G., Kemp, W.M., Boyton, W.R., 1984. The influence of waves and seagrass communities on suspended particulates in an estuarine embayment. *Mar. Geol.* 59, 85–103. doi:10.1017/CBO9781107415324.004

Warner, K., Frankel, E., 1987. Effects of  $\beta$ -Carotene on light stability of soybean oil 64, 213–218.

Watermann, B.T., Herlyn, M., Daehne, B., Bergmann, S., Meemken, M., Kolodzey, H., 2008. Pathology and mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in 2005 at the East Frisian coast, Germany. *J. Fish Dis.* 31, 621–630. doi:10.1111/j.1365-2761.2008.00953.x

Waycott, M., Duarte, C.M., Carruthers, T.J.B., Orth, R.J., Dennison, W.C., Olyarnik, S., Calladine, A., Fourqurean, J.W., Heck, K.L., Hughes, Ar., Kendrick, G.A., Kenworthy, Wj., Short, F.T., Williams, S.L., 2009. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 12377–12381. doi:10.1073/pnas.0905620106

Weisshaar, H., Böger, P., 1987. Primary effects of chloroacetamides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 28, 286–293. doi:10.1016/0048-3575(87)90027-7

Weisshaar, H., Retzlaff, G., Ger, P.B., 1988. Chloroacetamide Inhibition of Fatty Acid Synthesis Chloroacetamides are an established preemergent herbicide class ; their mode of action, however, has still to be elucidated. Cell metabolism is generally disturbed , and the most pronounced effects are 216, 212–216.

Weng, N., Wang, W., 2014a. Improved tolerance of metals in contaminated oyster larvae. *Aquat. Toxicol.* 146, 61–69. doi:10.1016/j.aquatox.2013.10.036

Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., Akcha, F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[alpha]pyrene, 17 alpha-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.* 85, 133–142. doi:DOI 10.1016/j.aquatox.2007.08.007

Wikström, Mårten (May 2010) Cytochrome c Oxidase. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net>. doi: 10.1002/9780470015902.a0000649.pub2

Wisely, B., Blick, R., 1967. Mortality of marine invertebrate larvae in mercury, copper, and zinc solutions. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 18, 63 – 72.

Wolins, N.E., Brasaemle, D.L., Bickel, P.E., 2006. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett.* 580, 5484–5491. doi:10.1016/j.febslet.2006.08.040

## Bibliographie

Wu, S., Lin, H., Yang, W., 2008. The effects of maternal Cd on the metallo-thionein expression in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae. *Aquat. Toxicol.* 87, 296–302.

Xu, D., Wen, Y., Wang, K., 2010. Effect of chiral differences of metolachlor and its (S)-isomer on their toxicity to earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1925–1931. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.07.035

Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54. doi:10.1038/nature11413

Zhang, Z., Xiaoxu, L., Vandeppeer, M., Zhao, W., 2006. Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 256, 502–509.

---

## ANNEXES

---



---

## **ANNEXE 1**

---

Experimental ecotoxicological study of the impact of a cocktail of pesticides  
and copper on the seagrass *Zostera noltei* in the Arcachon bay

## Experimental ecotoxicological study of the impact of a cocktail of pesticides and copper on the seagrass *Zostera noltei* in the Arcachon bay

GAMAIN Perrine<sup>1</sup>, FEURTET-MAZEL Agnès<sup>1</sup>, MAURY-BRACHET Régine<sup>1</sup>, AUBY Isabelle<sup>2</sup>, BELLES Angel<sup>1</sup>,  
BUDZINSKI Hélène<sup>1</sup>, DAFFE Guillemine<sup>1</sup>, GONZALEZ Patrice<sup>1</sup>

<sup>1</sup>: Univ. Bordeaux, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France

<sup>2</sup>: IFREMER, Arcachon , 33120, France

---

### Abstract

Dwarf eelgrasses (*Zostera noltei*) populations have been decreased since 2005 in the Arcachon Bay (southwest of France). Various stressors have been pointed out in this decrease. However, the role of xenobiotics like pesticides or copper (Cu) and of parameters involved in global change like temperature have never been explored yet. To determine the impact of these parameters, *Z. noltei* individuals were collected in a free-pollution site and then transferred to the laboratory in seawater microcosms. Dwarf eelgrass were exposed to pesticides cocktail and copper present alone or simultaneously at three different temperatures (10 ° C, 20 ° C, 28 ° C) representative of different seasons.. After two weeks of exposure to contamination, leaf growth, bioaccumulation of Cu in the leaves, and differential expression of target genes were studied.

Results show the ability of eelgrasses to bioaccumulate copper regardless of the temperature, with a reduced efficiency in the presence of the mixture: Cu and pesticides cocktail, at high temperatures. In addition, high temperatures exacerbate the effect of contaminants leading to growth inhibition and differential gene expression. Mitochondrial activity is strongly impacted and higher mortality rates occur.

---

## 1. Introduction

The Arcachon Bay is one of the most iconic coastal area from the southwest of France because of its wide extension and the biological diversity of its environment. This interface area between ocean, continent and atmosphere is also the meeting point for many economic activities such as oyster farming, fishing, and water sports, supporting the local economy. Agricultural production (mainly corn) is also active on its watershed. Close to the Bay, industrial activities are developed for a growing population. This high anthropic pressure leads to an increasing pollution context in the Bay.

Among xenobiotics identified in the water column, pesticides molecules, mainly herbicides and "anti-fouling" were determined in significant concentrations and have been followed for a decade (Auby and Maurer, 2004; Auby *et al.*, 2007; Auby *et al.* 2011). Indeed, the Leyre tributary is considered as the major input of pesticides in the Arcachon Bay, bringing more than 90% of the total pesticides in the Bay (REPAR report, 2010) with a majority of metolachlor, acetochlor and their metabolites. Cu is also widely found due to its common use as fungicide and bactericide treatment. The main source of this contamination could be attributed to agriculture and domestic uses (REPAR report, 2010), and the second to boating. Cu enters in the composition of different pesticides such as irgarol and diuron, used in antifouling paintings for water sports. Therefore, there is a growing anthropogenic pressure, which can cause disturbance in the ecological balance of the system.

The Arcachon Bay is characterized by the presence of the largest dwarf eelgrasses (*Zostera noltei*) beds in Europe. They have an ecological, economical and patrimonial interest through i) the indicators of disturbance and of development they provide to the coastal area, ii) their protective role by offering selected areas for spawning and nursery, and iii) their underwater landscape value (Auby *et al.* 2010). However, since 2005, a significant decrease of the *Z. noltei* biomass has been observed leading to the disappearance of this species in the eastern areas of the Bay (Auby *et al.* 2011). Indeed, the coverage of the seagrass beds decreased from 6092 to 4564 hectares between 2005 and 2007 (Auby *et al.* 2011). Many causes such as birds eating have been supposed to be involved in this decrease. However, the impact of climate changes and of pollutants like pesticides and Cu had never been explored to date. In this context, we focused on the possible impact of pollutants (pesticides cocktail and Cu) and of global change (temperature) on physiological and cellular functions of *Z. noltei*.

For this purpose, eelgrasses collected in a free-pollution site in the Arcachon Bay were exposed to contaminants (pesticides cocktail and Cu) separately or simultaneously in laboratory controlled conditions during two weeks at three different temperatures (10 ° C, 20 ° C, 28 ° C) representative of different seasons. To determine various effects of these compounds morphometric modifications, bioaccumulation and genetic impacts were studied from the growth of leaves, the bioaccumulation of Cu and the expression levels of target genes involved in mitochondrial metabolism, in photosystems I and II, and in oxidative stress responses.



## 2. Materials and methods

### 2.1 Biological model

This plant has very narrow (0.5 to 1.5 mm wide) and long leaves (4 to 20 cm length), with a rounded apex. Its vegetative apparatus consists of a rod creeping, called rhizome, bearing many roots grouped by two or three nodes. These nodes materialize the transition between the aerial and underground parts. Roots anchor the foot in the sediment.

Dwarf eelgrass, *Zostera noltei*, is a marine phanerogam species (Potamogetonaceae) that colonizes intertidal zones, and develops in large beds. Due to its colonization, every day, it undergoes temperature variations at each tide as well as seasonal variations. Seasonal variations in biomass generally follow a unimodal pattern, with a maximum in summer and minimum in winter, mainly based on vegetative reproduction. New leaves appear spring, and the herbarium grows by increasing the density of shoots derived from the continuous branching rhizome.

In 1984, seagrass *Z.noltei* occupied an area of 70 hectares in the Arcachon bay. However, since 2005, a significant decrease of the *Z. noltei* biomass has been observed leading to the disappearance of this species in the eastern areas of the Bay (Auby *et al.* 2011). In fact, the coverage of the seagrass beds decreased from 6092 to 4564 hectares between 2005 and 2007 (Auby *et al.* 2011).

However, this decrease in biomass, in addition to being misunderstood, is a crisis in the Arcachon bay. Indeed, eelgrass beds have an important role in the biological equilibrium. Leaves allow wildlife to take shelter against predators. Moreover, eelgrass beds increase the spatial heterogeneity of habitat. They also help to oxygenate the rhizosphere. That is why the presence of seagrass promotes diversity and abundance of aquatic fauna. Dwarf eelgrass, because of their presence in the form of major herbaria embedded in the substrate, stabilize it, reducing hydrodynamic constraints on the sediment. They reduce the rate of resuspension of fine particles and thus promote the transparency of the water and primary production.

### 2.2 Protocols and experimental design

After a pre-experiment, optimal growth condition exposure were established; i) because of their seasonal variations in biomass, three temperature were chosen: 10 ° C close to winter temperature, 20 ° C, close to their biomass optimum growth in spring and 28 ° C, close to summer temperature encountered in the Arcachon Bay ; ii) the most appropriate protocol of marking has been selected to the study of leaves growth ; iii) no nutrients supplementation in seawater was determined. In fact, nutrients concentrations in the sea water used were analyzed prior to the pre-experience on auto analyzer stream (AA3 Seal Analytical). Following these analyzes, the addition of phosphate appeared necessary to obtain concentrations necessary for optimal growth of eelgrasses (Plus, 2001). No significant differences in *Z.noltei* growth were observed between water supplemented and water not supplemented.

An experimental design was established to study separately or simultaneously the contamination process of pesticides cocktail contaminants and Cu. The experiment was carried out in glass tanks,

## Annexe

called experimental units (EUs), size 30 x 25 x 12 cm, filled with 6 liters of seawater sampled at Arguin sandbar.

Field sampling were carried out at low tide in the Arcachon Bay near Arguin sandbar considered as a free-pollution site in reference to previous studies. Clumps containing eelgrass rooted in their substrate were collected and installed in coolers containing a little water from the sampling zone to maintain eelgrass alive. These were brought directly to the laboratory.

Before introduction into the EUs, the sediment clods were washed in the laboratory under a low water current, over a sieve (mesh of 2.50 mm) to retain and separate only the feet of eelgrasses with their rhizomes (underground stems) and their roots, without sediment. This washing and preparation process of eelgrasses is recognized as being not harmful for *Z. noltei* (Plus, 2001). It allowed overcoming the problems of contaminants complexations with the sediment compartment by directly exposing eelgrasses feet to contaminants in the water column whose composition in nutrients has been controlled and regulated during the experiment. Being able to draw the nutrients in both the water and in the sediment, put them in the water of the EUs without contact with the sediment is not harmful to them (Plus, 2001). Once isolated, eelgrasses were tied with glass beads hanging at the end of a nylon string, and then immersed in each EU by nine. Plants were randomly positioned in the water to take into account the variations in light intensity (range 35-50  $\mu\text{mol}$  of photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) under a photoperiod of 16 h / 8 h.

Eelgrasses were then exposed to three different temperatures, 10 ° C (close to winter temperature), 20 ° C (close to their biomass optimum growth in spring) and 28 ° C (close to summer temperature) after an acclimatation period of 8 days during which the temperature has been increased of 2°C per day to reach the final temperatures of experimentation. For this, EUs are arranged in waterbath. Inside, resistors allow to bring the water bath at the desired temperature and thus adjust the Eus température.

Five conditions have been studied at each temperature: a "control" and a "solvent" condition to ensure the safety of the solvent used in the preparation of pesticides cocktail on the growth of eelgrasses; a "cocktail of pesticides" condition and a "copper" condition to study separately the effects of these molecules on eelgrasses; and a condition to study the effect of the mixture "cocktail of pesticides + copper " on this species. For each temperature and each condition, three replicates, each containing nine feet of eelgrasses were set-up: five feet planned to study eelgrass growth and Cu bioaccumulation, and four extra saved to perform genetic analyses. Thereby, for each temperature, 15 EUs were implemented, a total of 45 EUs

### **2.3 Contamination procedure**

For all conditions, the contamination procedure is performed through the water column and a constant pressure of contamination for a period of 14 days was provided.

Concentrations tested during the experiment were tenfold higher than those analyzed in the environment. They were chosen on purpose to clearly discriminate the effects of contaminants on the growth of eelgrasses, before considering further experiments, at environmental concentrations.

## Annexe

### 2.3.1 Copper contamination

From a stock solution of 1 mg CuCl<sub>2</sub> / L, an intermediate solution (0.1 mg CuCl<sub>2</sub> / L) was obtained by dilution and constituted the contamination solution. An addition of 0.6 mL of this solution is performed at T0, beginning of the experiment, in each UE "Copper" to reach the nominated concentration of 10 µg CuCl<sub>2</sub> / L. Every day, copper concentration was analyzed and adjusted by additions of aliquots of the contamination solution. For this, daily water samples were performed in each of the 18 EUs contaminated with copper and analyzed by spectrometry plasma torch 720 Agilent ICP-OES.

### 2.3.2 Cocktail of pesticides contamination

This pesticide solution contained various compounds, typically found in the bay, mainly from agricultural activities (herbicides, insecticides) and antifouling (herbicides and biocides) diluted in acetonitrile solution. Their individual concentrations are given in Table I. A decrease of irgarol, metolachlor and acetochlor had been previously reported during similar experimental conditions (personal communication), So, additional quantities of these three compounds were performed every two days (T2, T4; T6 T8; T10; T12) with a solution of intermediate contamination (Table I) to maintain the contamination pressure. For the solvent control, 2.8 mL of pure acetonitrile was introduced at T0 in each EU labelled "solvent control". Water samples were held every two days and stored at -20 ° C in order to know, in retrospect, the evolution of the concentration of pesticides in the experiments. Concentrations of pesticides were determined after solid phase extraction (SPE) with LC / M / MS (Liquid Chromatography / Tandem Mass Spectrometry) in MRM mode (Multiple Reaction Monitoring). Test concentrations were compared to nominal concentrations to refine the diagnostic impact.

Table I: List and concentrations of compounds in the cocktail of pesticides in the initially solution introduced and the intermediate solution

Solution of initial contamination T0			Solution of intermediate contamination	
Compounds	Concentration in the solution (µg/g)		Compounds	Concentration in the solution (ng/g)
Herbicide	Acétochlore	0,16	Irgarol	51
	Acétochlore ESA	3,99	Métolachlore	220
	Acétochlore OA	4,56	Acétochlore	70
	Metolachlore	0,49		
	Metolachlore ESA	3,87		
	Metolachlore OA	4,07		
	Diuron	0,11		
	Atrazine 2 hydroxy	0,28		
Fongicide	Carbendazime	0,06		
	Dichlofluamide	0,01		
	Chlorotalonil	0,03		
Antifouling	DMSA	0,05		
	DMST	0,15		
	Irgarol	0,07		
Insecticides	imidachlopride	0,96		

## Annexe

**2.4 Study criteria****2.4.1 Growth**

The most appropriate marking to the study of growth is the method described by Zieman (1974), modified by Vermaat *et al.* (1987) and adapted by Ribaudo (2006): using a needle, the top of the leaf sheath was pierced.

Several steps occur to perform reading sheet lengths and estimate leaf growth. At the end of the contamination period of the experiment (after 14 days) the numbering of the leaves of each shoot was made from the youngest (leaf number 1), which lies at the heart of the foot to the external leaves. For each leaf, the length  $L_i$  (mm), the width  $l_i$  (mm) and the length of new plant material produced, called length increase  $c_i$  (mm) were measured.

Plant growth was described by the following exponential formula (Vermaat *et al.* 1987):  $B_f = B_o \times e^{\mu t}$

$B_f$ , the final biomass (ug dw) ;  $B_o$ , the initial biomass (ug dw) ;  $\mu$ , the relative growth rate (d-1) and  $t$ , the time period considered (d). The relative growth rate  $\mu$  was based on the growth of all the leaves; It was obtained from the equation:

$$\mu = \frac{\ln(B_o + C) - \ln B_o}{t}$$

The calcul of the initial biomass  $B_o$  is :  $B_o = B_f - C$  ; the final biomass :  $B_f = R \times \sum_{i=1}^n (L_i \times l_i)$  ; but also the growth  $C = R \times \sum_{i=1}^n (L_i \times l_i)$

$R$  (ug dw.mm<sup>-2</sup>) expresses the ratio between the biomass and leaf area. To calculate, five leaves were harvested and dried in an oven at 45 °C for 48 hours. The dry weight of those five leaves obtained (representing the biomass) is divided by the sum area of the five leaves.

$n$  (leaves.foot-1) expresses the total number of leaves on the foot,  $i$  representing a leaf of the foot. New leaves, unmarked, located at tagging in the sheath may occur. Growth was then equal to the surface of the leaf above the sheath.

**2.4.2 Bioaccumulation of copper**

Copper concentration has been determined at T0 and T14 in the leaves of eelgrasses. After drying for 48 h at 45 °C in an oven, the samples were heated for 3 h at 100 °C in the presence of 63% nitric acid (2 mL). This organic matter digested releases bioaccumulate metals in ionic form which allows the determination of the total amount of metal. After cooling, samples were diluted by adding of 8mL of ultra-pure water (MilliQ water) and stored in a cold room at 4 °C until analysis conducted by spectrometry ICP-plasma torch Agilent 720 OES and accompanied by two sample controls (acid alone) and 4 certified samples. For pesticides, the amount bioaccumulated in eelgrasses could not be assayed.

### 2.4.3 Genetic study

#### 2.4.3.1 Studied genes

The nine genes studied were beforehand cloned and sequenced for the species *Z. noltei*. These genes were involved in different metabolic pathways. The  $\beta$  actin gene (*act*), involved in the formation of the cellular cytoskeleton, was chosen as reference gene. Indeed, in our condition this gene exhibited a stable expression profile. Three genes were involved in the oxidative stress response, mitochondrial superoxide dismutase (*sodMn*), catalase (*cat*) and glutathione peroxidase (*gpx1*). The genes for the subunit 1 of the cytochrome c oxidase (*cox1*), the sub-unit 5 of the NADH dehydrogenase (*nad5*) and 12S ribosomal RNA were representative of mitochondrial metabolism. Finally, two genes are involved in the functioning of photosystems, the photosystème I (*psaA*) and photosystème II (*d1*).

#### 2.4.3.2 Extraction of total RNA

Two feet of eelgrasses were taken at T = 7 days and T = 14 days for each condition and each replicates. The leaves were isolated and then introduced into microtubes containing 600  $\mu$ L of RNA Later. These samples were then stored at -20 ° C until total RNA extraction. Extraction was performed using the "Absolutely RNA Miniprep Kit" (Agilent) from 20 to 40 mg of plant tissue following the manufacturer's recommendations.

#### 2.4.3.3 Retro-transcription

RT was performed using the kit "Stratascript first strand synthesis system" (Agilent) from 14  $\mu$ L of total RNA (3 to 5  $\mu$ g). 1  $\mu$ L of an oligo dT solution [1  $\mu$ M], 1  $\mu$ L of an hexanucleotides solution [1  $\mu$ M], 0.8  $\mu$ L of a dNTP solution [10 mM], and 2  $\mu$ L of buffer activity 10X were added to RNAs. The sample was placed in a thermocycler (Eppendorf Mastercycler) for 5 min at 65 ° C to linearize RNAs, and allow primers (hexaprimers and oligodT) to fix. Then 1  $\mu$ L of reverse transcriptase [1U/ $\mu$ L] and 0.5  $\mu$ L of RNase block [0.5U] were added. The samples were then placed in the thermocycler for 1 hour at 42 ° C. The cDNA were stored at -20 ° C until their used in real-time quantitative PCR reactions.

#### 2.4.3.4 PCR-quantitative real-time

Differential expression of the genes studied was performed by in a MX3000P (Stratagene) using the "Brilliant III Ultra Fast SYBR Green QPCR Master Mix" (Agilent). Specific Primer-pairs were determined using the Lightcycler probe design software (Table II). Each PCR reaction performed in 96 well plates, included 17  $\mu$ L of reaction mix (10  $\mu$ L of Tp 2X (Syber green, Taq polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>), and 7  $\mu$ L H<sub>2</sub>O), 2  $\mu$ L of specific primer-pairs (2  $\mu$ M each) and 1  $\mu$ L of cDNA corresponding sample. The program began with an activation of the enzyme (95 ° C for 10 min) followed by 40 cycles of PCR: 95 ° C 30s, 55 ° C 30s, 72 ° C 30s. The quality of the amplification products was checked by analysis of thermal melting curves, conducted by gradually increasing the temperature from 60 to 95 ° C. The level of expression of each gene was determined relative to the reference gene ( $\beta$ -actin) using the  $2^{-\Delta C_t}$  method described by Livak *et al.* (2001).

Table II: Specific Primer-pairs

<u>Gene name</u>	<u>Primers</u>
<i>act</i>	Sens : GTGGCACCTGAAGAACATCC 64.8°C Anti-Sens : ACCATCACCTGAACCAAGC 64.7°C
<i>sodMn</i>	Sens : ACCACCGGGCCTATGT 65.5°C Anti-Sens : GTGTCGATAGCCCATCCTAGT 64.9°C
<i>cat</i>	Sens : AAGGGGTTCTTTGAGGTCAC 64.3 °C Anti-Sens : CGAGCAGGGTCATACCTTG 65.1°C
<i>gpx</i>	Sens : CGATTTACCGTTAAGGATGCC 64.7°C Anti-Sens : GGCTCCTGCCCTCAA 65.0°C
<i>cox1</i>	Sens : GCCACCAAGTCTCTTGCT 64.7 °C Anti-Sens : CCAGGTCCACGCATGT 64.6 °C
<i>nad5</i>	Sens : GCAAGATATGCGGAAGATGGG 64.3°C Anti-Sens : AGAGTAATAAGAAGTGAAAAGGACAGAG 64.6°C
<i>12S</i>	Sens : AGCACGTAGGCAGTTCAT 64.4°C Anti-Sens : GCACCTCAGCGTCGGTAG 65.5°C
<i>d1</i>	Sens : AATAGGGAGCCGCCGA 64.8°C Anti-Sens : GCGTCCTTGGATTGCTGT 65.3°C
<i>psaA</i>	Sens : GTTTAACTTGGGGAGGCGG 64.9°C Anti-Sens : CCCCTCTCCAGGTCCAT 65.0°C

## 2.5 Statistical Analysis

To analyze the data, the significance of the data between each condition was determined using the R software (<http://cran.r-project.org/>). Having at our disposal the quantitative variables, the samples were independent and the data was not normal, the Kruskal-Wallis tests were applied, the number of replicates was greater than 2. Subsequently, tests for pairwise comparisons of Kruskal (agricolae package) were performed.

## 3. Results

### 3.1 Copper concentration in experimental units and copper bioaccumulation in *Z.noltei*

A period of about 5-6 days was necessary to exactly achieve the desired concentration of 10 µg Cu / L in EUs contaminated with copper (Fig. 1). However, an average exposure of 9.2 µg/L has been set along the whole experience in EUs contaminated with Cu at 10 °C, and 8.7 µg.L-1 at 20 °C and 28 °C. In EUs contaminated with pesticides cocktail and Cu, an average exposure of 8.5 µg.L-1 has been set along the whole experience at 10 °C and 20 °C and 9 µg.L-1 at 28 °C.

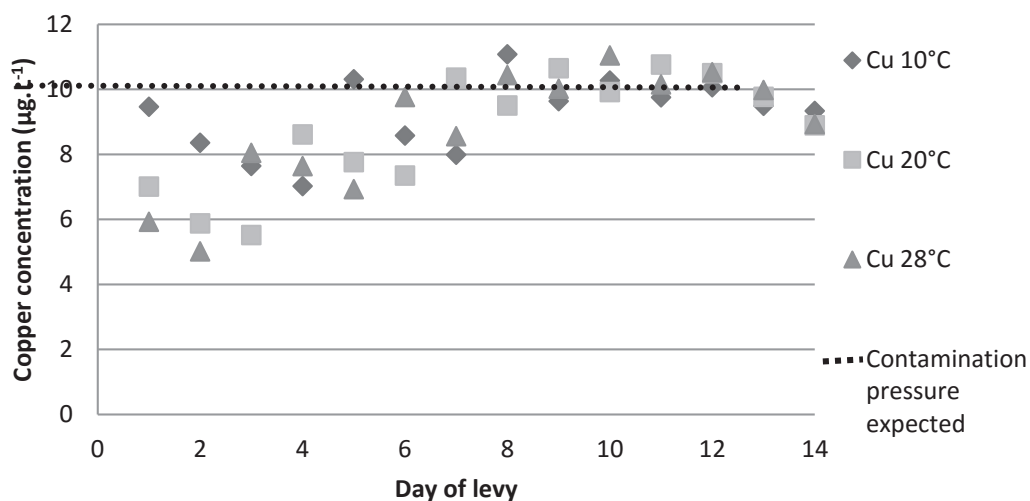


Figure 1: Copper concentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in experimental units contaminated with copper at different exposure temperatures over time

In control conditions at the different temperatures (10 °C, 20 °C and 28 °C) and at both times durations (T0 and T14) , no bioaccumulation was evidenced (Figure 2). In addition, bioaccumulation did not appear significantly different between T0 and T14 for controls eelgrasses at each temperature. However a significant difference was observed at 10 °C, 20 °C and 28 °C between controls eelgrasses at T0 and T14 and eelgrasses exposed to the two conditions of treatment after 14 days. For eelgrasses contaminated with copper alone, no significant difference of bioaccumulation was observed between the three exposure temperatures. In contrast, eelgrasses exposed to mixture " copper + cocktail" bioaccumulated significantly less copper at 28 °C: 6 times less and 4 times less than 10 °C or 20 °C respectively. At 28 °C, bioaccumulation appears significantly different between the two treatment conditions. Indeed, eelgrasses contaminated with the mixture «copper +cocktail " accumulated about 5 fold less copper than eelgrasses contaminated with just copper.

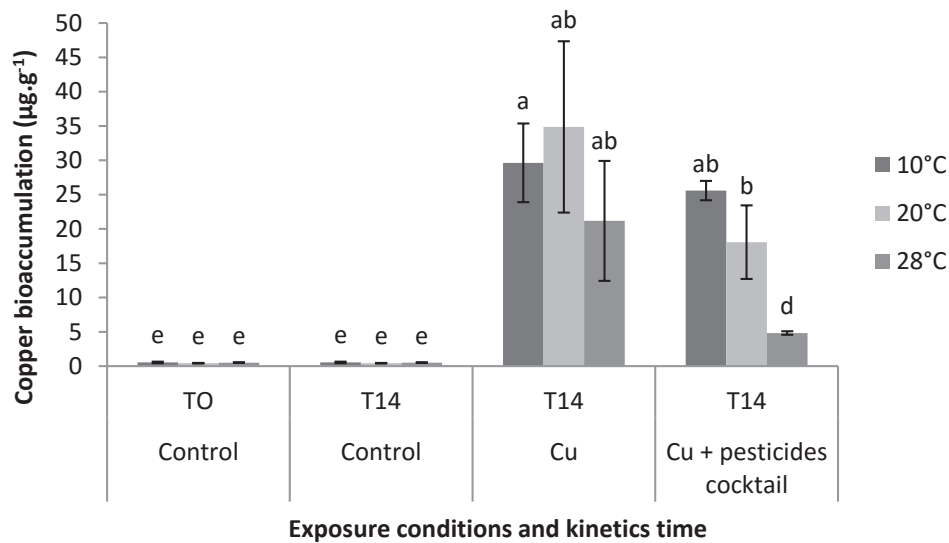


Figure 2: Cu bioaccumulation in the leaves of eelgrasses (Mean  $\pm$  SD) according to the temperature and exposure conditions at T0 and T14. Different letters indicated significant differences between different temperature and time exposure ( $p < 0.05$ )

### 3.2 Z. noltei leaf growth

At the time of sampling for analysis eelgrass growth, mortalities were observed. No mortality was observed at 10 ° C, 20 ° C or 28 ° C in the control condition. In contaminated conditions, the more the temperature increased, the more the mortality was important. Indeed, at 28°C about 20% of the *Z. noltei* tested died in contaminated-conditions.

A significant effect of temperature on the growth rate of eelgrasses ( $p$ -value  $< 0.001$ ) was observed. Indeed, all the individuals maintained at 28°C exhibited a lower growth rate than individuals at 10 and 20°C. However, no significant differences were observed between 10 and 20°C.

For each temperature, significant differences in growth rate regarding the treatment conditions were observed (Figure 3). Controls and solvent controls show no significant difference in growth between temperatures. **At 10 ° C**, a significant effect on growth rates between the control and eelgrasses exposed to pesticides cocktail or mixture "copper + cocktail" was evidenced while there was no effect of copper. For the three conditions of contamination, eelgrasses exposed to copper show a significantly different growth than eelgrasses exposed to cocktail, but neither the copper condition nor the cocktail of pesticides condition appear different from the "copper + cocktail" condition. **At 20 ° C**, copper or cocktail of pesticides had no significant effect on growth when they were performed alone. However a growth rate decrease was observed when Cu and pesticides were mixed. **At 28 ° C**, a greater negative effect on growth was evidenced. Indeed a dramatic decrease of the growth rate was observed for all the conditions. The lowest values were reported for plants exposed to contaminants with values always inferior to 0.01 days<sup>-1</sup>. There is a significant difference between eelgrasses exposed to contaminants alone and those exposed to mixture «copper + cocktail of pesticides».



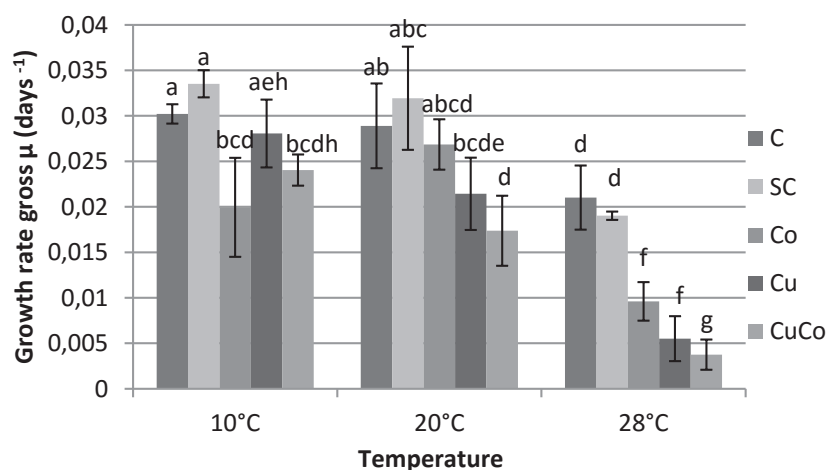


Figure 3: Growth rate gross of eelgrasses leaves (Mean  $\pm$  SD) according to the temperature (10 ° C, 20 ° C, 28 ° C) and exposure conditions (C : control, CS: solvent control, Co: cocktail of pesticides, Cu: copper and CuCo: copper and cocktail of pesticides associated). Different letters indicated significant differences between different temperature and condition exposure ( $p < 0.05$ ).

### 3.3 Genetic study

#### 3.3.1 Gene expression in controls exposed to different temperatures

Analysis of gene expression showed a basal expression for each temperature at each sampling time. Basal expression was significantly different between 10 ° C, 20 ° C and 28 ° C at T7 and T14 (Table III). At T7, compared to the basal expression observed at 20°C, the expression levels at 10°C of *12S*, *sodMn*, *gpx1*, *psaA* were increased, while *cat* and *d1* were significantly reduced. For the same kinetic point, *cox1* gene, *nad5*, *12S*, *d1* evidenced lower basal expression values at 28°C compared to 20°C, but *sodMn* and *gpx1* appeared to be higher. At T14 a significant decrease in gene *sodMn*, *d1*, *cox1*, *12S* was evidenced at 10 ° C and 28 ° C compared to 20 ° C.

Table III: Basal expression in *Z. noltii* observed in the leaves at 7 and 14 days for the three temperatures

Functions	Genes	Experimental units contaminated					
		Control T7			Control T14		
		10°C	20°C	28°C	10°C	20°C	28°C
Mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	5.9	2.5	<b>0.8</b>	<b>0.9</b>	8	<b>0.01</b>
	<i>nad5</i>	0.4	0.1	<b>0.02</b>	0.03	0.1	0.007
	<i>12s</i>	<i>58</i>	22	<b>6</b>	<b>4</b>	30	<b>3.4</b>
Oxidative stress	<i>sodMn</i>	<i>1</i>	0.1	6	<b>0.6</b>	1.4	<b>0.02</b>
	<i>cat</i>	<b>0.07</b>	0.1	0.1	0.05	0.2	0.01
	<i>gpx1</i>	<i>1.5</i>	0.1	<i>1.4</i>	1	3	0.2
Photosynthesis	<i>d1</i>	<b>31</b>	56	<b>1.8</b>	<b>3</b>	43	<b>1.1</b>
	<i>psaA</i>	5.7	0.5	1	0.9	0.8	0.04

**Black and fat** : significant decrease / **Black and italic** : significant increase

### 3.3.2 Gene expression in experimentally contaminated eelgrasses

In **copper-contaminated units** at T7 no significant effect for all the studied genes was observed at 10°C. At 20 ° C, a decrease in the expression of genes involved in the mitochondrial metabolism, the oxidative stress response (*cat*) and the gene of photosystem II (*d1*) was observed. In contrast, the glutathione peroxidase gene was overexpressed. At 28 ° C, the determined differential expressions were greater compared to 10 ° C and 20 ° C. Induction of genes involved in mitochondrial activity (*cox1*, *12S*) and photosynthetic activity (*d1*) and a decrease in genes responding to oxidative stress (*sodMn*, *gpx1*) was observed. After 14 days of contamination, the differential expression revealed a significant effect of copper at 10 ° C with a decrease in the expression of genes *psaA*, *cat*, *sodMn* and an increase in the expression of genes *cox1*, *gpx* and *d1*. At 20 ° C, repression of genes of mitochondrial activity continues, as well as two genes of photosystems I and II.

The strongest effects were, again, determined at 28 ° C, with a significant induction of genes of mitochondrial activity (146 and 45 fold increase for *cox1* and *12S*, respectively), genes of the oxidative stress response (51 fold induction of *sodMn*) and genes of photosystem (152 times for *psaA*).

Only few modifications in the expression pattern of the studied genes were observed at T7 and at 10°C in **the cocktail of pesticide contamination condition**. Indeed, only *cat*, *12S* and *psaA* were lightly overexpressed. The same was true at 20 ° C, where *gpx1* and *psaA* were increased. At 28 ° C, differential expression levels were higher. Thus, an increase by a factor included between 3 and 84 is described for the mitochondrial genes (*cox1* and *12S*) and photosystem II. Concerning mechanisms of defense against ROS, inhibition of *cat* and *sodMn* was measured, unlike glutathione peroxidase gene which was induced. After 14 days, the differential expression of almost all genes studied was increased whatever the temperature. However, in most cases, the highest factors inductions were found after exposure to 28 ° C.

**When both contaminants were applied together** at 7 days and at 10 ° C, inhibition of mitochondrial metabolism (*cox1* and *nad5*), photosynthetic activity (*d1*) and *sodMn* genes was observed. On the contrary, we can observe an increase for the *cat* gene. At 20 ° C, the observed response showed, in contrast, induction of genes *12S*, *psaA* and *gpx1*. At 28 ° C, an exacerbation of mitochondrial metabolism (*cox1*, *nad5*, *12S*) and photosystem II, but also a significant inhibition of genes responding to oxidative stress (*sodMn*, *cat*, *gpx1*) was evidenced. After 14 days of contamination, a gradual increase in the expression levels of almost all the genes studied was measured in accordance with the increase of temperature. Thus, at 10 ° C, only *nad5*, *12S*, *cat* and *d1* were induced. At 20 ° C, only *cat* and *d1* have levels similar to the control. At 28 ° C, *d1* and *gpx1* have levels identical to the control while the other genes are overexpressed (between 17 to 126 fold increase).

Table IV: Differential Gene Expression in *Zostera noltii* observed in leaves after exposure to copper, cocktail of pesticides used alone or mixed at 7 and 14 days.

Functions	Genes	Experimental units contaminated					
		Copper T7			Copper T14		
		10°C	20°C	28°C	10°C	20°C	28°C
Mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	/	<b>0.4</b>	5	4	<b>0.3</b>	146
	<i>nad5</i>	/	<b>0.2</b>	<b>0.2</b>	/	/	31
	<i>12s</i>	/	<b>0.1</b>	4	/	<b>0.1</b>	45
Oxidative stress	<i>sodMn</i>	/	/	<b>0.01</b>	<b>0.4</b>	/	51
	<i>cat</i>	/	<b>0.3</b>	/	<b>0.1</b>	/	22
	<i>gpx1</i>	/	10	<b>0.1</b>	5	/	/
Photosynthesis	<i>d1</i>	/	<b>0.3</b>	57	5	<b>0.3</b>	146
	<i>psaA</i>	/	/	/	<b>0.1</b>	<b>0.3</b>	152
Functions	Genes	Cocktail T7					
		Cocktail T7			Cocktail T14		
		10°C	20°C	28°C	10°C	20°C	28°C
Mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	/	/	8	13.5	3.5	310
	<i>nad5</i>	/	/	/	4	6	24
	<i>12s</i>	5	/	3	8.7	3.6	9
Oxidative stress	<i>sodMn</i>	/	/	<b>0.07</b>	/	/	8
	<i>cat</i>	2	/	<b>0.07</b>	/	26	6.5
	<i>gpx1</i>	/	3.9	2	12	<b>0.2</b>	/
Photosynthesis	<i>d1</i>	/	/	84	29	27	4.5
	<i>psaA</i>	3	4	/	3.5	3	5
Functions	Genes	Copper + Cocktail					
		Copper + Cocktail T7			Copper + Cocktail T14		
		10°C	20°C	28°C	10°C	20°C	28°C
Mitochondrial metabolism	<i>cox1</i>	<b>0.4</b>	/	29	/	5.7	126
	<i>nad5</i>	<b>0.3</b>	/	173	6	23	42
	<i>12s</i>	/	4	28	13	28	117
Oxidative stress	<i>sodMn</i>	<b>0.4</b>	/	<b>0.1</b>	/	<b>0.1</b>	17
	<i>cat</i>	6	/	<b>0.1</b>	3	/	57
	<i>gpx1</i>	/	4	<b>0.05</b>	/	<b>0.3</b>	/
Photosynthesis	<i>d1</i>	<b>0.3</b>	/	13	2	/	/
	<i>psaA</i>	/	3	/	/	10	88

The results are expressed as *induction factors* (> 2) or **repression** (<1/2) compared to control. /: Identical to the control.

## Discussion

In this study, an *ex-situ* approach has been conducted to be able to control factors such as temperature and concentration of contaminants in the experiment. Concentrations ten times higher than those observed in the environment have been chosen and applied to eelgrasses. In fact, the exposure time of 14 days is short compared to the almost constant exposure to the contaminants they encounter in

the Arcachon bay. In this first step, these concentrations allow us to discriminate the effects of contaminants on various endpoints (growth, bioaccumulation, genetic expression).

During the experiment, there was no effect of solvent used in the implementation of the cocktail of pesticides on the eelgrasses growth. The most important growth rate was obtained for eelgrasses present in control UEs at 10 °C and 20 °C with no significant difference between these two temperatures. However, the genetic study of *Z. noltei* in control conditions showed that they have a higher basal expression at 20 °C. Indeed at 10 °C at the end of 14 days of contamination the metabolism was slowed. At 28 °C this phenomenon their basal expression is even more pronounced at T7 and leads to a significantly lower growth rate for control eelgrasses observed after 14 days of experiment. Therefore, results show that *Z. noltei* growth is highly correlated with water temperature and appears optimal for a temperature of 20 °C whereas high temperatures slow it down. This is correlated with water temperatures at the beginning of eelgrasses growth (early spring: 18-20 °C, Ribaudou, 2006).

This temperature effect on *Z. noltei* growth is mainly visible *in situ* during summer season when the hot temperatures affect eelgrasses during low tides periods. In fact, the growth rate of controls eelgrasses was significantly different and lower at 28 °C. The genetic study of basal expression showed that changes of expression were most important at 28°C. Due to east-west gradients distance to the ocean and deep, eastern areas of the bay are exposed to temperature fluctuations of greater amplitude than areas further west. However, periods of high temperatures appear to have increased during the last decade, including heat waves summers in 2003 and 2006 (Auby *et al.* 2011). In coastal areas, the main consequences now proven were, among other things, an increase in global temperatures, oscillating, according scenarios, between 1.5 °C and 6 °C for the end of this century (GIEC, 2001). However, present overview showed a significant regression of sea grasses in the most eastern area of the bay. Thus, the increase of temperatures is probably a threat to their growth. This could explained, the current decline in *Z. noltei* populations in the most eastern areas and its possible future decline. This is in agreement with recent report on the regression of sea grass (Auby *et al.* 2011) which mentioned possible match between the intertidal sea grass decline and the frequency of occurrence of high temperatures, especially in the southern bay and on its eastern edge, making plausible the role of high temperatures (air and water) in the intertidal sea grass regression of the bay.

Beside this increased temperature, this study showed that the effects of the various contaminants in the Arcachon bay should be taken into account.

**Regarding the effects of isolated contaminants**, there is a lack of toxicological data on the effects of herbicide cocktails and / or the effect of metabolites. It does not allow concluding on the effect of molecules on dwarf eelgrasses populations in the bay. In this work, growth rates were significantly different between 10 °C and 28 °C and between 20 °C and 28 °C. However there was no difference between 10 °C and 20 °C for each contaminant alone and together, suggesting an exacerbation of the effect of contaminants at high temperatures.

Copper (Cu) is an essential metallic element for living organisms, but it becomes toxic above a certain concentration, depending on the organism (Flemming and Trevors, 1989). Sea grasses can accumulate trace metals such as Cu from the marine environment (Prange, 2000). The results obtained in this study revealed that eelgrasses contaminated to Cu accumulated on average 28 times more Cu than

## Annexe

eelgrasses in control conditions, whatever the temperature. Therefore, there was no effect of temperature on the potential Cu bioaccumulation.

At 10 ° C, Cu has no effect on the eelgrasses growth. A decrease of differential gene expression is noticeable, only after 14 days. Presumably time would be required for contaminants to have an effect and to impose organism damages. The metal toxicity was closely related to the factors controlling the tolerance of plants, including chemical interactions such as chelation (Prange, 2000). Plants have phytochelatins, metal sequestering proteins, responsible for tolerance to metal ions. Rauser (1995) showed that they act in the early days of contamination. This would explain the lack of clear Cu effect at 10 ° C during the first days of contamination.

At 20 ° C, no significant inhibition of the growth occurs. However as soon as 7days-contamination, Cu inhibits the genes expression of all functions studied, except *gpx1* which was induced. This gene is ubiquitously expressed in eukaryotic cells and plays a central role in protecting cells against oxidative damage (Briat and Lebrun, 1998). This may explain its induction. Indeed, Cu induced the production of reactive oxygen species (ROS) and free radicals because it stimulates reactions such as Haber-Weiss reactions and Fenton, producing these molecules (Hall, 2002). The bioaccumulation data revealed that Cu concentrations were similar between the three temperatures after 14 days of contamination, indicating that phytochelatins no longer act in trapping, all genes being inhibited after 14 days.

At 28 ° C, Cu caused a decrease in the growth rate significantly higher than at 10 ° C and 20 ° C. From 7 days of contamination, effects on gene expression were important. At T14 a significant impairment of the mitochondrial metabolism appeared. Indeed, the number of mitochondria (*12S* gene) as well as the expression levels of *cox1* (complex IV of the mitochondrial respiratory chain, located on the inner membrane of mitochondria) and *nad5* (complex I) increased, probably to maintain a sufficient pool of ATP and viability of cells. Lucia *et al.* 2009 have already shown this phenomenon in the cadmium study on seabirds, *Cairina moschata*, muscovy ducks. Therefore, at 28 ° C, eelgrasses try to counteract Cu impacts. Genes involved in the fight against reactive oxygen species (ROS) were strongly induced. In this way, Cu had been described to induce ROS production (Hall, 2002) which could explain the significant genes induction observed. However, it may also be that the increased number of mitochondria could cause an increase in ROS. Indeed, the electrons chain found in the mitochondrial membrane had been showed to be the major site of ROS production, particularly at complex I (Turrens, 1997). Exacerbating the effect of Cu rising temperatures has a strong impact, suggesting that, at these temperatures, the detoxification function of phytochelatin could not be enough to defend *Z. noltei*. Their dosage in future experiments could serve as a marker of exposure to heavy metal. It would reflect the response of the plant to this toxic substance.

After 7 days of contamination and at the three temperatures, no Cu effect on photosystem I was observed.

This result was consistent with previous research showing that Cu could affect the pigment-protein complex of photosystem II when present in excess (Cook *et al.*, 1997; Droppa *et al.*, 1984; Mohanty, 1988; Patsikka *et al.* 2002). It seems that photosystem II is a prime target of Cu in the early days of contamination, in contrast to photosystem I. After 14 days, the two photosystems were affected, indicating that eelgrasses can no longer fight.

## Annexe

Therefore, the Cu action was even stronger than the temperature increase effect and the exposure time was longer. Zevenhuizen *et al.* (1979) have observed that the Cu damage on bacteria are based on the exposure time. In addition, it has been shown that the speciation of an element, govern its toxicological properties, particularly for metals. These different forms may change depending on the physicochemical conditions of the environment such as temperature (Flemming and Trevors, 1989). So, the rise in temperature could lead to Cu speciation, making it more absorbable by eelgrasses. Bioaccumulation remaining the same regardless of the temperature, this hypothesis is refuted in our study. The author also stated that pH and redox potential were the main factors affecting the Cu toxicity. Therefore, in future studies, these two parameters should be followed to better understand the Cu action at elevated temperatures.

After contamination with the cocktail of pesticides, the results obtained have shown that it has an impact on gene expression from the 7th day of contamination for the three temperatures. At day 14, there was an exacerbation of the cocktail impact on all three functions studied and even greater with temperature increase. This correlates with the growth inhibition induced by cocktail at 10 °C and 28 °C. At 28 °C, higher mortality was observed in presence of contaminants. Moreover, there was a significant induction of gene expression of mitochondrial metabolism, resulting in an increase in mitochondrial numbers (12S gene), and even for the expression of genes *cox1* and *nad5*. It allows maintaining a sufficient pool ATP and having viable cells, offsetting the deleterious effect induced by the contaminant (Lucia *et al.* 2009). Therefore, summer temperatures and the presence of cocktail of pesticides made suffer organisms.

At 20 °C the mixture does not cause growth inhibition although effects on metabolism were noticeable. This may be because it was the optimum temperature for the growth of eelgrasses, allowing it to offset the negative effect of the cocktail on this parameter. Moreover, no mortality was observed at this temperature.

Therefore, the impact of pesticides was even higher than the temperature was higher and the exposure time was longer. Previous studies have already shown that high air temperatures amplify the toxic effects of chemical molecules (Gordon, 2003). It is possible to think that this observation is transposable to the aquatic environment. In addition, it appears that the action of the cocktail was more important than Cu action at the three temperatures both after 7 days and 14 days. In fact, there was an induction of all three genes functions studied. It has been shown that diuron action, one of the pesticides constituting the cocktail, results in greater inhibition of growth than Cu on the duckweed *Lemna minor* at concentrations of 10, 20 and 30 µg / L (Teisseire *et al.* , 1999) . This may explain the observation we made.

However, in natural environment, all contaminants are found in water simultaneously. In this study, it was demonstrated that the combination of Cu and cocktail of pesticides leads to important and significant inhibition of eelgrasses growth at 10 °C, 20 °C and 28 °C, while none of the contaminants used alone have effect at 20 °C. In addition, at 28 °C the association of contaminants has a higher effect, compared to Cu or cocktail alone, which raised with increasing temperature. This was also found in the genetic analyses.

Differential gene expression reveals, from 7 days at 20 °C and 28 °C, an increase in the expression of all genes studied. This induction increases to 14 days of exposure, especially as the temperature rises.

At 28 °C, Cu bioaccumulation Cu was significantly lower in the EUs "Cu + cocktail" compared to those observed at temperatures of 10 °C and 20 °C. The bioaccumulation observed was also lower for the same temperature in the presence of Cu alone. Therefore, at summer temperatures, in the presence of cocktail and Cu, plant is probably in metabolic distress and growth is minimized. All metabolic functions are activated at maximum to ensure its survival and bioaccumulation potential is diminished. It would be interesting to study the bioaccumulation of the cocktail of pesticides in the eelgrasses leaves to understand these phenomena more precisely.

The data acquired during Auby *et al.* study (2011) have shown that herbicides from agricultural sources (and their metabolites) were more concentrated in the zone of influence of the Leyre river, in the eastern part of the bay. But the decline of sea grass has not only been observed in this area. In this first analysis, this suggested that the presence of herbicides in water does not explain alone the decline of sea grass in the bay. Therefore, this study confirms that it is a multifactorial approach that mostly impact eelgrasses.

### Conclusions

This study showed that it is a multifactorial mode of action which would partly explain the decline of sea grass in the eastern areas of the Arcachon bay. The amplification of the contaminants effects under the action of high temperatures are mainly concerned. Mitochondrial activity was found to be heavily impacted and higher mortality rates occur in the condition of contamination at these temperatures. This situation is problematic due to frequent recurrence episodes of high heat and increased temperatures encountered. Even if contaminant concentrations would not increase in the coming years, the cumulative effect of rising temperatures and concentrations already present in the bay, could lead to an increase regression of the sea grass areas. However, from a spatial point of view, the pesticides concentrations measured in the bay are generally more important to the east, due to the dilution caused by ocean water flows to the west (Auby *et al.* 2011). However, the Arcachon Bay continues to urbanize, leading to increased anthropogenic inputs. It would be expected to see these concentrations increase in the coming years, especially in the eastern part of the bay. Settlements need to be taken to stop incorporation of Cu in antifouling composition and herbicide, but also a more rational use of all pesticides. Many technologies antifouling, biocides-free, are at the stage of research and development (surface self-cleaning like fur seals, dolphins artificial skin), while others have been developed as anti-adhesive coatings based silicone, forming water-repellent layer that prevents the fixing bodies (WWF).

Given the link between the presence of contaminants and eelgrasses growth, it is clear that healthy sea grass are present in ecosystems with a good quality and vice versa. Measuring the rate of expansion or reduction in the area of sea grass for spatio-temporal studies, would provide information on the evolution of the studied ecosystem and its quality. This supports the use of the health of sea grass as a bioindicator of the quality of tidal ecosystem (Waycott, 2009; Auby *et al.* 2010).

It would be interesting to perform growth analyzes on rhizomes of this plant to determine the impact of pesticides and Cu in this compartment.

However, the Arcachon bay is not the only coastal area in which sea grasses have declined. All regions of the globe where quantitative data were available showed a decline of sea grasses (Duarte, 2006;

## Annexe

Waycott *et al.* 2009). Waycott suggests that the rate of disappearance of sea grasses worldwide is comparable to that of mangroves, coral reefs or rainforests.

## References

- Auby I., Maurer D.** (2004) Etude de la reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon. Rapport final. Rapport Ifremer R.INT.DEL/AR/04.05, 203 p+ annexes.
- Auby I., Bocquené G., Quiniou F., Dreno J.P.** (2007) Etat de la contamination du Bassin d'Arcachon par les insecticides et les herbicides sur la période 2005-2006. Impact environnemental. RST/LER/AR/07.003, 33 p.
- Auby I., Oger-Jeanneret H., Sauriau P.G., Hily C., Barillé L.** (2010) Angiospermes des côtes françaises Manche-Atlantique. Propositions pour un indicateur DCE et premières estimations de la qualité. Rapport Ifremer RST/LER/MPL/10-15, 72 p + annexes.
- Auby I., Bost C.-A., Budzinski H., Dalloyau S., Desternes A., Belles A., Trut G., Plus M., Pere C., Couzi L., Feigne C., Steinmetz J.** (2011) Régression des herbiers de zostères dans le Bassin d'Arcachon : état des lieux et recherche des causes. Rapport Ifremer, RST/LER/AR/11.007, 155 p.
- Briat Jean-François, Lebrun Michel** (1998) Plant responses to metal toxicity, *Plant Biology and pathology*: 43-54
- Budzinski H., Tapie N., Belles A.** (2010) REPAR, Action 2 : Quantification de la présence Résultats des analyses chimiques sur les prélèvements ponctuels, 15p
- Cook C.M, A Kostidou, E Vardaka & T Lanaras** (1997) Effects of copper on the growth, photosynthesis and nutrient concentrations of *Phaseolus* plants. *Photosynthetica* **34**,179-193
- Droppa M., Terry N, Horvath G.** (1984) Variation in photosynthetic pigments and plastoquinone contents in sugar beet chloroplasts with changes in leaf copper content, *Plant Physiology* **74** : 717-720
- Duarte C.M, A.W.D. Larkum, R.J. Orth & (Eds)** (2006) Sea grasses: Biology, Ecology and Conservation, *Marine Ecology* **27**: 431–432
- Flemming C.A. et Trevors J.T.** (1989) Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, air and soil Pollution* **44**: 143-158
- Gordon C.J** (2003) Role of environmental stress in the physiological response to chemical toxicants, *Environmental Research* **92**: 1-7
- Hall J.L** (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, *Journal of Experimental Botany* **53**: 1-11
- Hily Christian** (2006) Fiche de synthèse sur les biocénoses : Les herbiers de Zostères marines (*Zostera marina* et *Zostera notlii*), 6p
- Livak K.J., Schmittgen T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T) (-Delta Delta C) method. *Methods* **25**, 402–408



- Lucia M, Anre J.M, Gonzalez P. , Baudrimont M., Gontier K., Maury-Brachet R., Davail S.** (2009) Impact of cadmium on aquatic bird *Cairina moschata*, *Biometals* **22** : 843-853
- Patsikka Eija , Marja Kairavuo, Frantisek S ersen, Eva-Mari Aro, and Esa Tyystjarvi** (2002) Excess Copper Predisposes Photosystem II to Photoinhibition in Vivo by Outcompeting Iron and Causing Decrease in Leaf Chlorophyll1 , *Plant Physiology* **129** : 1359-1367
- Plus Martin** (2001) Étude et modélisation des populations de macrophytes dans la lagune de Thau (Hérault, France). PhD Thesis, Paris 6, 1-107
- Prange J.A., Dennison W.C** (2000) Physiological responses of five seagrass species to trace metals, *Marine pollution bulletin* **41**: 327-336
- Mohanty N, Vass I, Demeter S** (1989) Copper toxicity affects photosystem II electron transport at the secondary quinone acceptor, QB. *Plant Physiology* **90**: 175–179
- Rausser W.** (1995) Phytochelatins and related peptides, *Plant Physiol.* **109**: 1141-1149
- Ribaudo Cristina** (2006) Étude de la croissance et des caractéristiques structurelles de *Zostera noltii* dans le Bassin d'Arcachon. Rapport de stage, Università degli studi di parma, programme Leonardo da Vinci., 31p.
- Teisseire H., Couderechet M., Vernet G.** (1999) Phytotoxicity of diuron alone and in combination with copper or folpet on duckweed (*Lemna minor*), *Environmental Pollution* **106**: 39-45
- Thursby G. B., Harlin M. M.** (1984) Interactions of leaves and roots of *Ruppia maritima* in the uptake of phosphate, ammonium and nitrate. *Marine Biology* **83**: (p 61-67)
- Turrens J.F.** (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosciences Rep.* **17**, 3-8.
- Vermaat J.E., Hootsmans M.J.M., Nienhuis P.H.** (1987) Seasonal dynamics and leaf growth of *Zostera noltii* Hornem , a perennial intertidal seagrass. *Aquatic Botany* **28**: 287-285
- Waycott M., Duarte M., Carruthers T.J.B. , Orth R.J., Dennison W.C., Olyarnik S., Calladine A., Fourqurean J.W., Hughes A.R., Kendrick G.A., Kenworthy W.J., Short F.T. ,Williams S.L.** (2009) Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal ecosystems ,12377-12381
- Zevenhuizen, L. R T. M., Dolfing, J., Eshuis, E. J., and Scholten-Koerselman, I. J.** (1979) Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration, *Microbial Ecology* **5**: 139-146
- Zieman J.C.** (1974) Methods for the study of the growth and production of the turtlegrass, *Thalassia testudinum* König. *Aquaculture*, **4**: 139-143

---

## **ANNEXE 2**

---

Protocole détaillé pour les biométries

## Protocole détaillé pour les biométries

1. Nettoyer les huîtres de toute vase et épibiontes et les placer sur le quadrillage numéroté.
2. Mesurer les huîtres dans leur plus grande longueur avec le pied à coulisse électronique.
3. Peser les huîtres, non ouvertes, avec la balance électronique pour obtenir le poids total.
4. Ouvrir les huîtres par la charnière, avec le couteau d'abord puis avec le scalpel pour trancher le muscle, bien racler le muscle et le manteau de la coquille supérieure.
5. Noter l'indice de maturité pour les 30 huîtres.

Indice 1 : impossible de récupérer des produits sexuels ;

Indice 2 : obtention de produits sexuels par forte pression sur la gonade ;

Indice 3 : obtention de produits sexuels du premier coup, par légère pression sur la gonade ;

Indice 4 : les produits sexuels sont obtenus sans pression sur la gonade.

6. Déposer la chair sur cinq couches de papier absorbant.
7. Noter l'indice de réserve en regardant particulièrement au niveau du capuchon céphalique, afin de ne pas confondre réserves et gonade :

Maigre (M) : les organes tels que le manteau ou les palpes labiaux sont transparents, la masse viscérale, plus foncée, est nettement visible ;

Peu Grasse (PG) : le manteau et le capuchon céphalique sont translucides ;

Grasse (G) : le manteau et le capuchon céphalique sont opaques ;

Très Grasse (TG) : le manteau est opaque et très épais, l'huître remplit complètement sa coquille.

8. Évaluer visuellement, pour chaque huître, la surface occupée par la gonade selon l'échelle suivante :

Indice 1 : la gonade occupe entre 0 et 25 % de la surface de l'huître ;

Indice 2 : la gonade occupe entre 25 et 50 % de la surface de l'huître ;

Indice 3 : la gonade occupe plus de 50 % de la surface de l'huître.

9. Essuyer les coquilles avec du papier absorbant.
10. Retourner la chair des huîtres et les placer sur une zone non humide du papier absorbant.
11. Noter, pour chaque huître, l'indice d'infestation par le vers *Polydora sp.* des coquilles, suivant l'échelle suivante :

Indice 0 : pas de traces de *Polydora*, ni galerie, ni chambre ;

Indice 1 : présence de petites galeries, pas de chambre ;

Indice 2 : pas plus de 2 chambres et surface infestée < 10 % ;

Indice 3 : plus de 2 chambres ou surface infestée comprise entre 10 et 25 % ;

Indice 4 : surface infestées > 25 %.

12. Noter, pour chaque huître, l'indice d'infestation par le copépode *Mytilicola sp.*, selon l'échelle suivante :

Indice 0 : pas de signes visibles d'une infestation ;

Indice 1 : *Mytilicola sp.* visible dans le tube digestif de l'huître.

13. Peser les coquilles avec la balance électronique.
14. Prendre une photographie des huîtres égouttées.
15. Mettre les chairs d'huîtres égouttées dans les sachets numérotés. Ne pas fermer les sachets.
16. Peser les sachets avec la balance électronique. L'obtention du poids frais de chair s'effectue en soustrayant le poids du sachet précédemment obtenu.
17. Sur les huîtres numéro 26 à 30, prélever le muscle.
18. Mettre les sachets pesés au congélateur.

A faire plus tard :

19. Une fois les huîtres congelées, les lyophiliser.
20. Peser les sachets contenant les chairs sèches avec la balance électronique.

---

## **ANNEXE 3**

---

Numéro d'enregistrement unique auprès de la banque de données  
de Chemical Abstracts Service des différents composés analysés dans  
les huîtres adultes au cours des campagnes 2013 et 2014

**Numéro d'enregistrement unique auprès de la banque de données de Chemical Abstracts  
Service des différents composés analysés dans les huîtres adultes au cours des campagnes**

**2013 et 2014**

	N° CAS
<i>1-(2,4-Dichlorophenyl)urée</i>	5428-50-2
<i>1-(3,4-Dichlorophenyl) urée</i>	2327-02-8
<i>1-(3,4-Dichlorophenyl)-3-méthyl urée</i>	3567-62-2
<i>Acétochlore</i>	34256-82-1
<i>Acétochlore ESA</i>	947601-84-5
<i>Acétochlore OA</i>	194992-44-4
<i>Acide dimercaptosuccinique</i>	2418-14-6
<i>Alachlore</i>	15972-60-8
<i>Amethryn</i>	834-12-8
<i>Atrazine</i>	1912-24-9
<i>Atrazine-déséthyl</i>	6190-65-4
<i>Atrazine-désisopropyl</i>	1007-28-9
<i>Atrazine 2 hydroxy</i>	2163-68-0
<i>Azoxystrobine</i>	131860-33-8
<i>Bentazone</i>	25057-89-0
<i>Carbendazime</i>	10605-21-7
<i>Carbetamide</i>	16118-49-3
<i>Carbofuran</i>	1563-66-2
<i>Carbosulfan</i>	55285-14-8
<i>Chlorotoluron</i>	15545 - 48 - 9
<i>Chlorsulfuron</i>	64902-72-3
<i>Cyanazine</i>	21725-46-2
<i>Cyromazine</i>	66215-27-8
<i>Diflufenican</i>	83164-33-4
<i>Dimétachlore</i>	50563-36-5
<i>Diuron</i>	330-54-1
<i>N,N-diméthyl-N'-p-tolylsulphamide</i>	66840-71-9
<i>Flazasulfuron</i>	104040-78-0
<i>Fluazifop-p-butyl</i>	79241-46-6
<i>Flusilazole</i>	85509-19-9
<i>Hexazinone</i>	51235-04-2
<i>Hydroxy simazine</i>	2599-11-03
<i>Imidaclopride</i>	138261-41-3
<i>Irgarol</i>	28159-98-0
<i>Isoproturon</i>	34123-59-6
<i>Linuron</i>	330-55-2
<i>Métazachlore</i>	67129-08-2

<i>Methiocarb</i>	2032-65-7
<i>Métolachlore</i>	51218-45-2
<i>Métolachlore ESA</i>	171118-09-5
<i>Métolachlore OA</i>	152019-73-3
<i>Metoxuron</i>	19937-59-8
<i>Metsulfuron-methyl</i>	74223-64-6
<i>Nicosulfuron</i>	111991-09-4
<i>Promethryn</i>	52645-53-1
<i>Propachlore</i>	87810-56-8
<i>Propazine</i>	139-40-2
<i>Propiconazole</i>	60207-90-1
<i>Prosulfuron</i>	94125-34-5
<i>Pymethroline</i>	123312-89-0
<i>Quizalofop-ethyl</i>	76578-14-8
<i>Quizalofop-tefuryl</i>	119738-06-6
<i>Simazine</i>	122-34-9
<i>Terbutryn</i>	886-50-0
<i>Terbutylazine</i>	5915-41-3
<i>Terbutylazine desethyl</i>	30125-63-4
<i>Thiamethoxam</i>	153719-23-4



---

## **ANNEXE 4**

---

Mesure des températures (°C) dans les micropuits avant enregistrement des vidéos (T<sub>0h</sub>) et après enregistrement (T=2min) pour chacun des couples utilisés (numérotés de 1 à 4)



**Mesure des températures (°C) dans les micropuits avant enregistrement des vidéos (T<sub>0</sub>) et après enregistrement (T=2min) pour chacun des couples utilisés (numérotés de 1 à 4)**

**Couple 1**

	T <sub>0</sub> (en °C)	T 2min (°C)
Témoin Rép 1	22	22
Témoin Rép 2	22	21
Témoin Rép 3	22	21
Cuivre 1µg/L Rép 1	20	20
Cuivre 1µg/L Rép 2	20	20
Cuivre 1µg/L Rép 3	20	20
Cuivre 10µg/L Rép 1	20	20
Cuivre 10µg/L Rép 2	20	20
Cuivre 10µg/L Rép 3	20	20
Métolachlore 10 ng/L Rép 1	20	20
Métolachlore 10 ng/L Rép 2	20	20
Métolachlore 10 ng/L Rép 3	20	20
Métolachlore 100 ng/L Rép 1	20	20
Métolachlore 100 ng/L Rép 2	20	20
Métolachlore 100 ng/L Rép 3	20	20

**Couple 2**

	T <sub>0</sub> (°C)	T 2 min (°C)
Témoin Rép 1	23	22
Témoin Rép 2	22	21
Témoin Rép 3	21	21
Cuivre 1µg/L Rép 1	21	21
Cuivre 1µg/L Rép 2	21	21
Cuivre 1µg/L Rép 3	21	21
Cuivre 10µg/L Rép 1	21	21
Cuivre 10µg/L Rép 2	21	21
Cuivre 10µg/L Rép 3	21	21
Métolachlore 10 ng/L Rép 1	21	21
Métolachlore 10 ng/L Rép 2	21	21
Métolachlore 10 ng/L Rép 3	21	21
Métolachlore 100 ng/L Rép 1	21	21
Métolachlore 100 ng/L Rép 2	21	21
Métolachlore 100 ng/L Rép 3	21	21

**Couple 3**

	T 0 (°C)	T 2 min (°C)
<b>Témoin Rép 1</b>	23	22
<b>Témoin Rép 2</b>	22	22
<b>Témoin Rép 3</b>	22	22
<b>Cuivre 1µg/L Rép 1</b>	22	21
<b>Cuivre 1µg/L Rép 2</b>	21	21
<b>Cuivre 1µg/L Rép 3</b>	21	21
<b>Cuivre 10µg/L Rép 1</b>	21	21
<b>Cuivre 10µg/L Rép 2</b>	21	21
<b>Cuivre 10µg/L Rép 3</b>	21	21
<b>Métolachlore 10 ng/L Rép 1</b>	21	21
<b>Métolachlore 10 ng/L Rép 2</b>	21	21
<b>Métolachlore 10 ng/L Rép 3</b>	21	21
<b>Métolachlore 100 ng/L Rép 1</b>	21	21
<b>Métolachlore 100 ng/L Rép 2</b>	21	21
<b>Métolachlore 100 ng/L Rép 3</b>	21	21

**Couple 4**

	T 0 (°C)	T 2 min (°C)
<b>Témoin Rép 1</b>	23	22
<b>Témoin Rép 2</b>	22	22
<b>Témoin Rép 3</b>	22	22
<b>Cuivre 1µg/L Rép 1</b>	22	22
<b>Cuivre 1µg/L Rép 2</b>	22	22
<b>Cuivre 1µg/L Rép 3</b>	22	21
<b>Cuivre 10µg/L Rép 1</b>	21	21
<b>Cuivre 10µg/L Rép 2</b>	21	21
<b>Cuivre 10µg/L Rép 3</b>	21	21
<b>Métolachlore 10 ng/L Rép 1</b>	21	21
<b>Métolachlore 10 ng/L Rép 2</b>	21	21
<b>Métolachlore 10 ng/L Rép 3</b>	21	21
<b>Métolachlore 100 ng/L Rép 1</b>	21	21
<b>Métolachlore 100 ng/L Rép 2</b>	21	21
<b>Métolachlore 100 ng/L Rép 3</b>	21	21



---

## ANNEXE 5

---

Nombre moyen de naissains par type de collecteur (écart type)  
présents à la fin de la saison de reproduction (septembre novembre)  
et au moment du détroquage (printemps de l'année suivante)

Nombre moyen de naissains par type de collecteur (écart type) présents à la fin de la saison de reproduction (septembre novembre) et au moment du détroquage (printemps de l'année suivante) (issu de Auby et al., 2014).

Année	Tuiles			Coupelles			
	Nb total/tuile sept-nov	% mortalité observée sept-nov	Nb vivants /tuile sept-nov	Nb/tuile printemps suivant	Nb total /coupelle sept-nov	% mortalité observée sept-nov	Nb vivants/ coupelle sept-nov
1985	5 176 (1 431)			1 093 (139)			
1986	389 (139)			172 (8)			
1987	399 (131)			182 (13)			
1988	841 (170)			224 (11)			
1989	3 800 (517)						
1998	46 (17)						
1999	5 420 (3 200)						
2000	323 (166)						
2001	3 292 (1 260)						
2002	45 (30)						
2003	20 920 (7 212)						
2004	5 821 (3 275)						
2005	58 (44)						
2006	11 600 (5 000)						
2007	63 (78)						
2008	2 751 (1 419)	18,7 (10,5)	2 274 (1 324)		256 (195)	19,6 (9,3)	206 (-)
2009	129 (52)	29,5 (19,3)	90 (45)		11 (7)	-	
2010	271 (111)	17,9 (10,6)	222 (96)		11 (6)	-	
2011	201 (136)	31,8 (17,6)	132 (88)		12 (9)*	-	
2012	3 500 (1 450)	24,3 (10,9)	2 700 (1 200)		235 (92)	26,7 (11,4)	174 (72)
2013	6 236 (3 596)	3,1 (3,8)	5 995 (3 575)		273 (198)	11,0 (9,0)	248 (194)
2014	21 578 (10 799)	5,8 (3,8)	20 312 (10 229)		2 136 (1 172)	7,8 (3,4)	1 981 (1 111)