



HAL
open science

Environnement & Conchyliculture : étude des effets des microplastiques et pesticides chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, des Pertuis Charentais

Arno Bringer

► **To cite this version:**

Arno Bringer. Environnement & Conchyliculture : étude des effets des microplastiques et pesticides chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, des Pertuis Charentais. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2021. Français. NNT : 2021LAROS012 . tel-03623085

HAL Id: tel-03623085

<https://theses.hal.science/tel-03623085>

Submitted on 29 Mar 2022

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 / LA ROCHELLE UNIVERSITÉ & UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Pour obtenir le titre de DOCTEUR
(ÉCOLE DOCTORALE EUCLIDE N° 618)

Par

ARNO BRINGER

Unités de recherche : Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs - UMR 7266)

Environnement et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC - UMR 5805)

Environnement & Conchyliculture : Étude des effets des microplastiques et pesticides chez l'huître creuse, Crassostrea gigas, des Pertuis Charentais

Thèse CIFRE portée par le Comité Régional de la Conchyliculture Charente-Maritime (CRC 17)

Projet AQUAECOs:

Amélioration de la **QUALité** Environnementale en zones **CO**nchyloles des Pertuis Charentais

Thèse présentée et soutenue à La Rochelle, le 30 Juin 2021

Devant le jury composé de :

Sylvie Gobert – Professeure
Université de Liège, UR FOCUS (*Rapporteur*)
Katherine Costil – MCF, HDR
Université de Caen, UMR BOREA (*Rapporteur*)
Xavier Cousin – Chargé de recherche
INRA, UMR Marbec (*Examineur*)
Valérie Thiéry – Professeure
La Rochelle Université, UMR LIENSs (*Examineur*)

Laurent Champeau – Directeur
Comité Régional Conchylicole 17 (*Membre invité*)
Jean-Philippe David – Docteur & Directeur
Syndicat Mixte Bassin de la Seudre (*Membre invité*)
Hélène Thomas – MCF, HDR
La Rochelle Université, UMR LIENSs (*Directrice de thèse*)
Jérôme Cachot – Professeur
Université de Bordeaux, UMR EPOC (*Co-directeur de thèse*)



Financements & accompagnements

La thèse décrite et présentée ci-après, fait partie intégrante du projet **AQUAECO**s (Amélioration de la **QUAL**ité **Environnementale** en zones **CON**chylicoles des Pertuis Charentais). Cette thèse est soutenue par le dispositif CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche) qui permet de subventionner toute entreprise de droit français qui embauche un doctorant pour le placer au cœur d'une collaboration de recherche avec un ou plusieurs laboratoires publics. La thèse a été soutenue et portée, *via* le dispositif CIFRE par le Comité Régional Conchylicole Charente-Maritime (CRC 17). Ce projet de thèse a été financé par plusieurs autres partenaires : le Parc Naturel Marin de l'estuaire de la Gironde et de la Mer des Pertuis, le Conseil Départemental de la Charente-Maritime ainsi que la région Nouvelle-Aquitaine. Les travaux de recherche ont été effectués au sein du laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (UMR 7266 LIENSs, La Rochelle Université) et du laboratoire Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (UMR 5805 EPOC, Université de Bordeaux).



Partenariats scientifiques

Durant cette étude de thèse, plusieurs partenariats scientifiques ont été engagés afin de réaliser les expérimentations présentées dans ce manuscrit. Le Marais expérimental CNRS (L'Houmeau) a été utilisé comme structure d'accueil pour les expérimentations sur les stades tardifs de développement ainsi que pour les suivis à long terme (larves pédivéligères et naissains). Avec ses infrastructures aquacoles, le Marais CNRS était indispensable à la bonne réalisation des études mises en place. Une convention de collaboration a été signée avec l'écloserie de bivalves France Naissain (Bouin) afin de nous mettre à disposition des géniteurs matures pour les fécondations en laboratoire, ainsi que la livraison des larves pédivéligères avant la mise en exposition dans nos installations expérimentales. De même pour le Cedre (Brest), où des analyses ont été réalisées sur les macroplastiques collectés sur le littoral des Pertuis Charentais, avec l'identification des phtalates et HAP à la surface des plastiques en pyrolyse GC-MS. Des analyses d'eau de mer et dans les tissus d'huîtres ont aussi été réalisées pour quantifier le Chlortoluron (herbicide d'intérêt dans le cadre de notre étude). Le site d'analyse Qualyse (La Rochelle) nous a permis d'accéder aux bases de données récentes des pesticides dosés dans les eaux des Pertuis Charentais afin de réaliser notre sélection de molécules d'intérêt et de connaître leurs concentrations dans les eaux des Pertuis Charentais. Ovive (La Rochelle) nous a rendu des prestations de broyage essentielles pour obtenir les microplastiques issus des macroplastiques environnementaux collectés sur le littoral des Pertuis Charentais. La SCIC T.E.O (La Rochelle), bureau d'étude spécialisé sur la thématique de la pollution plastique, nous a épaulé tout au long de ce projet, avec des données cartographiques macroplastiques. Agilent Technologies (Waldbronn, Allemagne) a réalisé des analyses d'identification et quantification des microplastiques dans des échantillons de sédiments sableux sur le littoral. Enfin, l'IPREM (Université de Pau) a rendu possible l'identification et la quantification des éléments métalliques en surface des plastiques vieilliss dans l'environnement marin (en cours).



**Agilent
Technologies**

*« Mieux vaut prendre le changement par la main
avant qu'il ne nous prenne par la gorge. »*

Winston Churchill

Remerciements

Je tiens tout d'abord à grandement remercier le Comité Régional de la Conchyliculture Charente-Maritime pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de lancer ce beau projet. Un grand merci à Laurent Champeau (directeur du CRC 17) pour son aide lors de la mise en place du projet AQUAECOs et son engagement. Au sein du CRC 17, je souhaite remercier Benoit Durivaud (vice-président), pour sa gentillesse, son professionnalisme et la confiance qu'il m'a accordé. Merci aussi à Gérald Viaud (ancien président du CRC 17) et Daniel Coirier (actuel président du CRC 17). Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe du CRC 17, même si le manque de temps ne m'a pas permis d'être présent très souvent, et notamment Charlotte Rhone, Félix Ansart, Mélissa Michaud, Christine Boisseau et Cindy Gobin.

Ce projet n'aurait pas pu voir le jour, sans l'aide et la confiance des partenaires et financeurs d'AQUAECOs. Dans ce contexte, je remercie le Parc Naturel Marin et notamment Yohan Weiller (chargé de mission pêche et aquaculture), pour son engagement dans ce projet.

Un grand merci à Solène Prieur pour le soutien du Département Charente Maritime. Je remercie également la Région Nouvelle-Aquitaine. Je tiens à remercier également Tony Agion (Qualyse, La Rochelle), pour nos échanges et la mise à disposition des données pour le bon déroulé du projet.

Il est temps d'adresser un énorme merci à Hélène Thomas (directrice de thèse), qui a su me faire confiance dès le départ et m'a accompagné dans le montage du projet, mais aussi qui a su me donner une totale autonomie dans la réalisation de mes travaux de thèse et qui a su me guider dans les étapes expérimentales, les publications, la mise en place des comités... et un énorme merci aussi pour tous ces échanges réalisés ensemble sur mon futur professionnel et sur les projets en perspectives. Dans le même sens, un grand merci à Jérôme Cachot (co-directeur de thèse), qui m'a accueilli sur le site de Talence à Bordeaux pour me former aux tests écotoxicologiques, mais aussi pour me guider tout au long de cette thèse.

Sylvie Gobert, Katherine Costil, Xavier Cousin, Valérie Thiéry, Jean-Philippe David et Laurent Champeau, je tiens à vous remercier d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche.

Pour l'équipe du LIENSs (Littoral Environnement et Sociétés, La Rochelle), un énorme merci à Emmanuel Dubillot pour tous nos bons moments passés durant ces trois rapides années, pour ton aide lors des expérimentations au laboratoire ou au Marais expérimental CNRS, pour nos galères, nos sueurs et nos moments de rires. Merci à Fabien Aubert, pour son aide lors des besoins urgents des étuves thermostatées ou pour l'utilisation du formol, et même pour nos bons moments passés à discuter ensemble. Je tiens à remercier Valérie Huet, pour toutes ces journées à doser des biomarqueurs de toxicité, et à calibrer le spectrophotomètre. Merci à Ingrid Arnaudin pour son accueil au sein du laboratoire Marie-Curie (LIENSs, La Rochelle) afin de réaliser les acquisitions vidéos de comportement de nage des larves, et un grand merci à Grégoire Prunier qui m'a épaulé, aidé et formé sur le microscope Zeiss. Merci à Martine Bréret pour son aide et ses conseils lors des cultures d'algues au LIENSs et les équipements de laboratoire. Je continue par remercier Johan Guiard et Lucia Picard pour leurs aides et leurs efforts lors des paperasses administratives et lors des passages de commandes, essentiels aux travaux réalisés pendant cette thèse.

Merci à Marine Breitwieser lors de mon début de thèse pour tes conseils et ton expérience. Je remercie aussi Marine Barbarin pour les moments de discussion dans notre bureau partagé. Mais je remercie aussi tous les doctorants avec qui j'ai pu partager, profiter et rigoler et plus particulièrement Vincent

Remerciements

Hamani et Antoine Minet. Merci à Marion Pillet et Adélaïde Lerebours (post-doctorat) pour nos échanges et nos projets communs. Merci aussi à Armelle Combaud pour les moments passés ensemble lors des interventions en écoles et communications organisées ensemble. Pour finir je remercie les deux directeurs de l'équipe AMARE, au sein du LIENSs : Thomas Lacoue-Labarthe et Jérôme Fort. Je remercie tous mes stagiaires, qui ont participé au projet AQUAECOs sous ma tutelle, et qui m'ont grandement aidé à avancer dans ce projet : Bénédicte Lalot, Marie Armange, Léa Prigent, Clémence Epinoux, Louise Evin, Romain Gonzalvez, Noémie Bossut, Morgane Delacour. Je remercie également toute l'équipe de la FST (Faculté des Sciences et Technologies) pour leur accueil lors de mes enseignements et un grand merci à Christine Trichet pour son aide lors des créneaux de Travaux Pratiques & Dirigés.

Concernant l'équipe EPOC à Bordeaux, je remercie chaleureusement Christelle Clérandeau pour tous ses conseils et son professionnalisme. Je remercie également Bénédicte Morin pour les échanges lors des pauses déjeuners. Et un grand merci à Charlotte Lefebvre, en doctorat sur les mêmes thématiques que moi, pour nos discussions, nos échecs, nos réussites et tous nos échanges constructifs. Je remercie aussi Floranne Le Bihanic pour son aide lors des expérimentations sur le cytomètre en flux et merci à Bettie Cormier lors de nos rencontres à Bordeaux. Merci également à l'équipe de la Station Marine d'Arcachon pour leurs engagements dans ce projet et notamment à Damien Tran pour son investissement lors des expérimentations valvométriques.

Je tiens à remercier l'équipe du Cedre de Brest, lors de mon passage dans leur structure, et notamment à Stéphane Le Floch pour nos travaux communs et nos échanges. Merci également à Camille Lacroix pour les tests réalisés sur l'extracteur de microplastiques, et à Ronan Jezequel et Justine Receveur pour les dosages réalisés en pyrolyse GC-MS. Je remercie également la SCIC T.E.O et notamment son gérant Fabrice Faurre pour nos échanges et projets discutés longuement ensemble. Un grand merci aussi à François Benitez, lors de nos travaux communs sur le projet EVOLPEC/LITTOPEC et les enquêtes réalisées dans les coins les plus reculés de la région pour aller à la rencontre des professionnels de la filière ostréicole et mytilicole.

Un énorme merci à ma famille et mes amis pour leurs soutiens lors de certaines périodes plus dures que d'autres. A côté de l'intérêt que je porte pour les activités de recherche et les longues études, l'objectif est aussi de vous rendre fier de ce travail. Mon dernier merci s'adresse à toi Lorène, qui est resté à mes côtés pendant ces trois années souvent dures, compliquées, chargées et intenses. Mille merci de m'avoir accompagné les weekends pour collectés des plastiques, ou de se rendre au Marais CNRS expérimental nourrir les huîtres en développement, et encore merci d'avoir été présente durant les périodes de confinements et de doutes psychologiques et d'avoir su me changer les idées quand il le fallait.

Table des matières

Financements & accompagnements	2
Partenariats scientifiques	4
Remerciements	8
Table des matières.....	11
Liste des figures (hors publication)	14
Liste des tableaux (hors publication).....	16
Acronymes & abréviations (hors publications).....	17
INTRODUCTION GÉNÉRALE & OBJECTIFS DE LA THÈSE.....	19
CHAPITRE I – État de l’art.....	29
A. La conchyliculture sur le territoire des Pertuis Charentais	31
1. Les Pertuis Charentais.....	31
1.1 Caractéristiques générales	31
1.2 Les données environnementales.....	33
1.3 L’urbanisation	34
2. Contexte historique de la conchyliculture Charentaise.....	35
2.1 La naissance de la conchyliculture jusqu’au année 2000.....	35
2.2 Les crises de mortalités et le contexte actuel de la conchyliculture.....	36
3. Les enjeux socio-économiques	38
3.1 L’activité conchylicole	39
3.1.1 L’importance des mollusques bivalves marins en France.....	39
3.1.2 L’économie conchylicole dans les Pertuis Charentais	40
3.2 Les activités agricoles dans les Pertuis Charentais	41
B. Le modèle biologique : l’huître creuse (<i>Crassostrea gigas</i>)	42
1. Présentation de l’huître creuse	42
2. Les méthodes de production.....	43
3. L’habitat et l’aire de répartition	45
4. L’anatomie et la nutrition.....	46
5. La reproduction et le cycle de vie	47
5.1 La gamétogénèse, ponte et fécondation	47
5.2 Les stades larvaires.....	48
6. L’intérêt écotoxicologique de l’huître creuse	49
C. Les contaminants testés en conditions expérimentales	50
1. Les microplastiques.....	50
1.1 La production et l’industrialisation des plastiques.....	50
1.2 La pollution par les plastiques dans les écosystèmes marins	52
1.3 Les microplastiques : origine et devenir.....	55
1.4 Les conséquences des microplastiques sur les écosystèmes marins.....	58
1.5 Les impacts des microplastiques sur l’huître creuse (<i>C. gigas</i>).....	60
1.6 Les plastiques utilisés en aquaculture	62
2. Les produits phytosanitaires : pesticides.....	64
2.1 Généralités.....	64
2.2 Les pesticides des Pertuis Charentais.....	64
2.2.1 Pesticides et ostréiculture	64
2.2.2 Les réseaux de surveillances et suivis de pesticides.....	65
2.2.3 Les pesticides d’intérêt de cette étude.....	66
2.3 Les effets des pesticides sur différents modèles d’études aquatiques	69
2.3.1 Les effets des pesticides d’intérêt de cette étude sur les organismes aquatiques	69

2.3.2	Les effets écotoxicologiques sur les stades précoces de développement, chez l’huître creuse (<i>C. gigas</i>).....	71
2.3.3	Processus de vectorisation des pesticides sur les plastiques	72
CHAPITRE II	– Démarches expérimentales & méthodologiques.....	75
A.	La démarche expérimentale	77
B.	Quelques outils méthodologiques.....	78
1.	L’embryotoxicité.....	78
1.1	Le test d’embryotoxicité sur les stades précoces de développement	78
1.2	Le comportement de nage	79
1.3	La culture phytoplanctonique.....	80
2.	La valvométrie	81
2.1	La mesure de l’activité valvaire chez l’huître creuse (<i>C. gigas</i>).....	81
2.2	Les analyses des données HFNI.....	82
3.	Les systèmes expérimentaux pour le maintien en développement et expositions à différents stades de vie chez l’huître creuse (<i>C. gigas</i>).....	82
CHAPITRE III	- Évaluation & caractérisation de la pollution plastiques (macro/micro) sur un site d’étude pilote des Pertuis Charentais	85
	Préambule	87
A.	<u>Article 1</u> : État des lieux de la contamination plastique et identification d’additifs de phtalates sur les plastiques ostréicoles, sur un site pilote des Pertuis Charentais	88
CHAPITRE IV	– Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryo-larvaire et pédivéligère chez l’huître creuse (<i>C. gigas</i>)	102
	Préambule	104
A.	<u>Article 2</u> : Effets des microplastiques commerciaux de différentes tailles de polyéthylène (HDPE) sur le développement et l’activité natatoire au stade embryo-larvaire de l’huître creuse (<i>C. gigas</i>) ...	106
B.	<u>Article 3</u> : Ingestion et effets sur le développement et le comportement natatoire sur les larves d’huître creuse (<i>C. gigas</i>) de microplastiques commerciaux fluorescents	118
C.	<u>Article 4</u> : Évaluation de la toxicité et des risques de six pesticides commerciaux, sur le développement, la croissance et le comportement larvaire de l’huître creuse (<i>C. gigas</i>)	131
D.	<u>Article 5</u> : Effets des microplastiques environnementaux aquacoles vieilliss, sur la fixation des larves pédivéligères et la croissance des naissains chez l’huître creuse (<i>C. gigas</i>).....	145
CHAPITRE V	– Effets des microplastiques & pesticides sur les stades tardifs d’huître creuse (<i>C. gigas</i>)	157
	Préambule	159
A.	<u>Article 6</u> : Effets de contaminants chimiques commerciaux (microplastiques de polyéthylène (HDPE) et/ou d’un herbicide) sur le comportement valvaire des naissains d’huître creuse (<i>C. gigas</i>)	161
B.	<u>Article 7</u> : Effets intergénérationnels des microplastiques aquacoles vieilliss dans l’environnement, à divers stades de vie (survie/fécondation au stade adulte et génération larvaire) chez l’huître creuse (<i>C. gigas</i>)	174
CHAPITRE VI	- Discussion générale.....	201
A.	Les microplastiques et les pesticides affectent-ils les stades précoces de développement chez l’huître creuse (<i>C. gigas</i>) ?	205
B.	Les microplastiques et les pesticides affectent-ils les stades plus tardifs chez l’huître creuse (<i>C. gigas</i>) ?	208
C.	La pollution plastique des Pertuis Charentais encore mal connue	211

D. Les enjeux environnementaux et sociétaux : conchyliculture et contaminants	215
1. Les enjeux liés aux microplastiques.....	215
2. Les enjeux liés aux pesticides	218
CHAPITRE VII - Conclusions & perspectives.....	222
RÉFÉRENCES	227
ANNEXES	266
Annexe 1 – Contributions scientifiques	267
Annexe 2 – Travaux complémentaires du projet AQUAECOs (volet environnemental).....	272
Annexe 3 – « Supplementary data » des différents articles scientifiques.....	276
Annexe 4 – Figures complémentaires.....	282

Liste des figures (hors publication)

Figure 1. Logo élaboré pour le projet AQUAECOs.....	22
Figure 2. L’huître creuse, <i>Crassostrea gigas</i> , utilisé en tant que modèle d’étude expérimental.	22
Figure 3. Expérimentations à différents stades de vie chez l’huître creuse (<i>Crassostrea gigas</i>), avec expositions aux MP et pesticides commerciaux ou environnementaux.	25
Figure 4. Schéma organisationnel récapitulant les différents objectifs décrits dans les chapitres du manuscrit de thèse.	26
Figure 5. Carte des Pertuis Charentais, avec ses principaux fleuves, s’y déversant. D’après les travaux de Moussard, 1998.....	32
Figure 6. Résultats d’enquêtes sur la qualité des eaux observés par les principaux professionnels en relation avec les eaux littorales des Pertuis Charentais. D’après les résultats du projet LITTOPEC (Benitez & Bello, 2020).	37
Figure 7. Représentation des activités économiques des Pertuis Charentais. D’après les travaux d’Alice Bello (programme LITTOPEC, 2019-2020).	39
Figure 8. Recensement de la conchyliculture en France (Agreste, 2014).	40
Figure 9. Utilisations des surfaces agricoles de Charente-Maritime. D’après les données de Lafargue (2019).	41
Figure 10. Différents événements marquants dans l’ostréiculture française et évolution des tonnages de productions pour les trois espèces élevées. D’après Buestel <i>et al.</i> (2009) ; Gouletquer & Héral (1997) et Bernard (2011).	43
Figure 11. Méthodes de production de l’huître creuse en éclosion puis en milieu marin. D’après Miossec <i>et al.</i> (2009) et Helm <i>et al.</i> (2006).....	44
Figure 12. Carte mondiale de distribution géographique de l’huître creuse (<i>C. gigas</i>). D’après Miossec <i>et al.</i> (2009).	45
Figure 13. Quelques éléments d’anatomie chez l’huître creuse (<i>C. gigas</i>). Schéma réalisé d’après les travaux de stage de Bénédicte Lalot (2020). © Bénédicte Lalot et Arno Bringer.	46
Figure 14. Cycle de développement larvaire chez l’huître (<i>C. gigas</i>). D’après Auby & Maurer (2004).	48
Figure 15. Explosion de la production et consommation du plastique dans le monde et en Europe depuis 1970. D’après Bouwmeester <i>et al.</i> (2015) et PlasticsEurope (2013).	50
Figure 16. Modélisation en fonction de 3 scénarios de la quantité de plastiques mal gérés et relargués dans l’environnement. (Scénario A) aucune modification des comportements et politiques actuelles ; (Scénario B) Amélioration de la gestion des déchets plastiques ; (Scénario C) Amélioration et diminution des quantités produites. D’après Lebreton & Andrady (2019).	51
Figure 17. Types de plastiques utilisés dans la consommation Française. D’après les données de l’Atlas du plastique (2020).	52
Figure 18. Chiffres clés de la gestion des plastiques en France. Modifié d’après des données de Eurostat (2016).	53
Figure 19. Voies d’entrées et de sorties du plastique dans l’environnement marin. D’après Jambeck <i>et al.</i> (2015) et UNEP et GRID-Arendal (2016).	54
Figure 20. Distribution des tailles de plastiques, micro et nanoplastiques en relation avec les groupes potentiels d’espèces affectés par ces particules. D’après GESAMP (2015) et UNEP et GRID-Arendal (2016).	54
Figure 21. Les zones de déchets plastiques dans les océans. D’après Lebreton <i>et al.</i> (2018) et Enders <i>et al.</i> (2015).	56

Figure 22. Différentes espèces du milieu marin sont impactées directement par les plastiques ou indirectement <i>via</i> la chaîne trophique. D’après Lusher (2015) et UNEP et GRID-Arendal (2016).	58
Figure 23. Potentielle ingestion de particules de plastiques par les bivalves. D’après UNEP et GRID-Arendal (2016).....	62
Figure 24. Photographies des trois principaux plastiques ostréicoles utilisés par les professionnels et potentiellement retrouvés sur les littoraux (la coupelle, le tube de captage et la poche ostréicole). (a) Plastiques ostréicoles neufs et (b) vieillis dans l’environnement des Pertuis Charentais. Photographies réalisés lors des prélèvements sur le littoral charentais (© Arno Bringer).....	63
Figure 25. Formule chimique de la molécule de Nicosulfuron.	67
Figure 26. Formule topologique de la molécule de Chlortoluron.	68
Figure 27. Formule topologique de la molécule de la Boscalid.	68
Figure 28. Interactions entre les MP et les pesticides (POP) pouvant amener une double toxicité chez les organismes bioaccumulateurs de MP. D’après les travaux de Mammo <i>et al.</i> (2020).....	73
Figure 29. Schéma de synthèse des différentes expérimentations mises en place durant la thèse, sur trois stades de vie chez l’huître creuse (<i>C. gigas</i>) et différents polluants (MP et pesticides) représentatifs de la pollution des Pertuis Charentais.	77
Figure 30. Système de filtration pour l’eau de mer. Photographie réalisée au cours des expérimentations (© Arno Bringer).	78
Figure 31. Culture de phytoplancton en conditions contrôlées, en erlenmeyer (à gauche) puis en colonne de culture (à droite). Photographies réalisées au cours des expérimentations (© Arno Bringer).	80
Figure 32. Huître équipée d’électrodes reliées au valvomètre pour l’acquisition des données de comportement valvaire. D’après les travaux de Tran <i>et al.</i> (2003).	81
Figure 33. Représentation des dispositifs et systèmes pour le maintien en développement et l’exposition à différents stades de vie chez l’huître creuse (<i>C. gigas</i>). Photographies réalisées au cours des expérimentations (© Arno Bringer).	83
Figure 34. Schéma résumant les travaux réalisés dans le cadre de l’Article 1.....	89
Figure 35. Schéma récapitulatif des travaux effectués sur les stades embryo-larvaire, larvaire et pédivéligère, exposés aux MP et pesticides.	105
Figure 36. Schéma résumant les travaux réalisés dans le cadre de l’Article 2.....	107
Figure 37. Schéma résumant les travaux réalisés dans le cadre de l’Article 3.....	119
Figure 38. Schéma résumant les travaux réalisés dans le cadre de l’Article 4.....	132
Figure 39. Schéma résumant les travaux réalisés dans le cadre de l’Article 5.....	146
Figure 40. Schéma récapitulatif des travaux effectués sur les stades naissains et adultes, exposés aux MP et pesticide.	160
Figure 41. Schéma résumant les travaux réalisés dans le cadre de l’Article 6.....	162
Figure 42. Schéma résumant les travaux réalisés dans le cadre de l’Article 7.....	175
Figure 43. Cycle de vie de l’huître creuse (<i>C. gigas</i>), montrant les différents résultats collectés durant les travaux de thèse sur les effets des MP et pesticides. Modifié d’après Vogeler <i>et al.</i> (2016) et Luan <i>et al.</i> (2019).	204
Figure 44. Effets des MP commerciaux et environnementaux sur les jeunes stades de vie (larves-D et pédivéligères) de l’huître creuse (<i>C. gigas</i>). Les LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) sont exprimées pour les paramètres les plus sensibles.....	206
Figure 45. Interactions entre les MP et pesticides dans les environnements marins « Cheval de Troie ». Modifié d’après les travaux de Zhang <i>et al.</i> (2020b).....	210
Figure 46. Récapitulatif des résultats AQUAECOs (volet expérimental et environnemental) sur la contamination plastique d’un site des Pertuis Charentais (sud-ouest, Atlantique, France).	

Détermination des concentrations en MP dans le sédiment sableux de plage, le sédiment marin, l'eau de mer et le biote (huîtres creuses). Complété d'après les travaux de Lerebours (2021). Photographie de fond réalisée lors d'une campagne de prélèvement (© Arno Bringer).....212

Figure 47. Ingestion de MP par transfert trophique, de l'huître creuse jusqu'à l'Homme. D'après les travaux de Baechler *et al.* (2020).216

Figure 48. Schéma global de la contamination microplastiques dans le milieu marin sur les espèces de bivalves, telles que l'huître creuse (*C. gigas*). Modifié d'après Zhang *et al.* (2020a).224

Figure A1. Carte des sites d'études de prélèvements du volet environnemental AQUAECO. Modifié d'après les travaux de Lerebours (2021).272

Figure A2. Représentation des méthodes de conversion massique (MP/L en mg/L) afin de comparer les concentrations retrouvées dans l'environnement des Pertuis Charentais et les concentrations testées dans le cadre des travaux de thèse. LOEC correspond à la plus faible concentration ayant montré un effet en conditions expérimentales. D'après les travaux de Jambeck *et al.* (2015) ; Pico & Barcelo (2019) ; Lebreton & Andrady (2019) et Yu *et al.* (2020a).....282

Liste des tableaux (hors publication)

Tableau 1. Quelques exemples d'études expérimentales écotoxicologique sur le stade embryo-larvaire chez *Crassostrea gigas*, en exposition à différents contaminants.49

Tableau 2. Quantification des MP dans différents compartiments (eau de surface, sédiments marins et biote) de l'environnement marin. Ces données ont été acquises sur les secteurs géographiques européens et français. Les données (sur fond gris) correspondent à des études réalisées sur un secteur proche des Pertuis Charentais.57

Tableau 3. Liste des principaux pesticides détectés dans les Pertuis Charentais. Les trois pesticides surlignés en jaune sont les pesticides sélectionnés pour ce travail de thèse. Les concentrations maximales détectées dans les fleuves des Pertuis Charentais sont exprimées en $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les données de ventes en Charente-Maritime (2015-2017) sont exprimées en kg. Ces données sont issues de Léonard, 2017 ; Recema, 2017 ; Action program, Coastal water quality in shellfish growing areas, Qualyse, CD 17, 2020.67

Tableau 4. Seuils de concentrations réglementaires des trois pesticides d'intérêt (Nicosulfuron, Chlortoluron et Boscalid) sur le secteur des Pertuis Charentais (Ineris, 2013).....69

Tableau A1. Quantification des microplastiques dans les huîtres sur les différents sites d'étude aux quatre temps de prélèvements (Lerebours, 2021).....274

Acronymes & abréviations (hors publications)

BaP benzo[a]pyrène

CD 17 Comité Départemental de Charente-Maritime (17)

CAPENA Centre pour l'aquaculture, la pêche et l'environnement de Nouvelle-Aquitaine

CDNB 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene

Cedre Centre de documentation, de recherche et d'expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux

C. gigas *Crassostrea gigas*

CRC 17 Comité Régional de la Conchyliculture Charente-Maritime

CREAA Centre Régional d'Expérimentation et Application Aquacole

DCE Directive Cadre sur l'Eau

DC SMM Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin

DDT Dichlorodiphényltrichloroéthane

DDTM Direction Départementale des Territoires et de la Mer

DMP Diméthylphtalate

EDDS Acide éthylènediamine-N, N'-disuccinique

EDTA Acide éthylènediaminetétraacétique

EPOC Environnements et Paléoenvironnements

Océaniques et Continentaux

EVOLPEC EVOLution du littoral sous contrainte naturelle et anthropique & apport à la réglementation dans les Pertuis Charentais (projet LIENSs)

GSH Glutathion

GST Glutathion-S-Transférase

HAP Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

HDPE Polyéthylène haute densité

LAC Laccase

LDPE Polyéthylène basse densité

LIENSs Littoral Environnement et Sociétés

LITTOPEC Enjeux environnementaux sur le littoral des Pertuis Charentais (projet LIENSs)

LOEC Low Observed Effect Concentration

MDA Malondialdéhyde

Min Minutes

MP Microplastiques

NMPI N- methyl-2-phenylindole

NP Nanoplastiques

PA Polyamide

PBS Tampon Phosphate Salin

PC Pertuis Charentais

PCB Polychlorobiphényle

PCL Polycaprolactone

PE Polyéthylène

PET Polyéthylène Téréphtalate

PFOS acide perfluorooctanesulfonique

PLA Acide Polyactique

PNM Parc Naturel Marin de l'estuaire de la Gironde et Mers des Pertuis

POP Polluants Organiques Persistants

PP Polypropylène

PPD P-phenylenediamine

PS Polystyrène

PVC Polyvinyl de chloride

PVT PolyVinylToluène

REMY Réseau de contrôle Microbiologique

REPHY Réseau de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines

REPOM Réseau national de surveillance de la qualité des eaux et des sédiments des Ports Maritimes

ROCCH Réseau d'Observation de la Contamination Chimique

SAU Surface Agricole Utilisée

SHS Sciences Humaines et Sociales

STS Sciences et Technologies en Société

SOD Superoxyde Dismutase

VMC Valve Micro-Closure – Microfermetures

2n Diploïdes

3n Triploïdes

4n Tétraploïdes

INTRODUCTION GÉNÉRALE & OBJECTIFS DE LA THÈSE

Les zones côtières constituent des milieux d'interface, en constante évolution, entre les écosystèmes terrestres et marins. Les systèmes fluvio-estuariens génèrent des flux unidirectionnels de polluants des bassins versants continentaux vers les zones littorales et constituent le principal vecteur de la contamination par le transport de contaminants dissous ou associés aux particules en suspension (Andrady, 2011). En plus des atteintes à la biodiversité, les contaminations des zones côtières ont des conséquences sur l'économie liée aux activités littorales notamment la conchyliculture. Avec près de 130 000 tonnes d'huîtres creuses produites et commercialisées chaque année en France, le secteur conchylicole du département de la Charente-Maritime, représente le premier bassin de production Français (22 % de la production nationale). L'activité représente 25 000 emplois directs et son chiffre d'affaire annuel est d'environ 300 millions d'euros, l'essentiel étant réalisé dans le secteur de Marennes-Oléron (Mille & Le Moine, 2011). Cependant, la conchyliculture rencontre de nombreuses crises depuis plusieurs décennies. La situation s'est récemment dégradée en raison de mortalités exceptionnelles de naissains d'huîtres, survenues à partir de 2008 et qui perdurent. Durant les années 2008, 2014 et 2016, les zones conchylicoles en région Poitou-Charentes (ancienne région, devenue Nouvelle-Aquitaine) représentent des espaces fragilisés par les crises de surmortalités des huîtres (de l'ordre de 80-90 % ; Mille & Le Moine, 2011). Les conchyliculteurs s'interrogent sur leurs productions futures. Les Pertuis Charentais représentent un patrimoine naturel et économique exceptionnel dans la région du Sud-Ouest de la France. Plusieurs activités font la richesse de cette région, comme le tourisme, la pêche, le nautisme et l'aquaculture. Le Bassin de Marennes-Oléron représente une part importante de ce patrimoine, avec une activité conchylicole reconnue et labellisée (*i.e.* Label rouge). L'aquaculture doit relever le défi de la cohabitation dans un milieu de plus en plus soumis à d'autres usages et attentes sociétales. Pour l'aquaculture, il s'agit en particulier d'un enjeu majeur pour envisager son développement, à l'heure où notre balance commerciale est déficitaire. Pour la conchyliculture, il s'agit d'assurer sa pérennité, à plus long terme. De plus, l'image environnementale de la profession conchylicole est critiquée, avec la présence de matériaux plastiques d'origine conchylicole souvent trop présents sur les espaces littoraux, occupés par les activités touristiques.

Au début des années 2000, des liens entre les apports terrigènes (pesticides notamment) et les mortalités importantes de bivalves dans les secteurs conchylicoles placés aux débouchés de fleuves/estuaires ont été explorés (Soletchnik *et al.*, 2015). Dans les Pertuis Charentais, des pics de concentrations sporadiques mais significatifs d'herbicides ont été enregistrés en sortie de Seudre, dans certaines zones de production du Bassin de Marennes-Oléron (Soletchnik *et al.*, 2005a ; Burgeot *et al.*, 2007) et en sortie des canaux de marais littoraux (au sud de la Charente, Masson & Dubernet, 2006). Des mesures effectuées en fleuve Charente ont porté sur les molécules suivantes : le Métolachlore, le Glyphosate et de son métabolite (l'AMPA). Jusqu'à 11 onze molécules ont été détectées simultanément dans le Bassin de Marennes-Oléron, représentant une somme de concentration pouvant atteindre $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ de pesticides (Munaron, 2004). Les résultats d'une précédente synthèse confirment l'effet toxique de cocktails de pesticides, tant sur les algues que sur les mollusques marins (Arzul & Quiniou, 2014).

Dès le début de l'histoire de l'Humanité et de leur conquête, les mers et les océans ont toujours été considérés comme des puits de déchets illimités en raison de leur capacité de dispersion, de dilution, et de redistribution de substances naturelles et synthétiques. Or, au cours des dernières décennies, il a été admis que cette capacité était limitée (Santos *et al.*, 2015). En plus des contaminations aux pesticides, l'augmentation constante de la production de plastiques ces dernières décennies a généré une accumulation de déchets plastiques dans les écosystèmes aquatiques, et plus particulièrement côtiers. L'étude de ces composants plastiques est devenue une nécessité puisque leur persistance a déjà été

démontrée (Cole *et al.*, 2013). Les avantages présentés par les plastiques : polyvalence, résistance, et durabilité face à la dégradation sont bien connus et font qu'aujourd'hui, nous sommes entrés dans «l'âge du plastique», avec son omniprésence dans notre quotidien (Avio *et al.*, 2017). La production mondiale de ce matériau a considérablement augmenté dans le monde au cours des 60 dernières années, passant de 0,5 millions de tonnes par an en 1960 à près de 350 millions de tonnes en 2017. Après les «lanceurs d'alerte» des années 1970, lors de la mise en évidence de particules plastiques d'une taille mesurable en millimètre, s'ensuit l'apparition du terme microplastique (MP) en 2004 puis de nanoplastique (NP) (Thompson *et al.*, 2004). Cependant, bien que le processus de dégradation des déchets plastiques génère des MP de taille inférieure à 5 mm, puis des NP de taille inférieure à 1 μm (Arthur *et al.*, 2009), ce n'est que très récemment que des études scientifiques se sont intéressées à la toxicité des MP/NP (Chae & An, 2017). Il y a trois sources principales d'apport de MP dans les océans. Les plastiques produits (produits manufacturés, textile, pneus) et rejetés sont susceptibles de se désagréger biologiquement, chimiquement ou mécaniquement dans l'environnement terrestre ou marin sous forme de MP (Andrady, 2015). Ils peuvent aussi contaminer l'environnement directement sous forme de particules de plastiques, comme des microbilles, sélectionnées pour leur propriété abrasive, et largement utilisées dans les cosmétiques, l'industrie pharmaceutique ainsi que l'industrie des traitements de surface (produits d'abrasion) et les peintures. Il peut également s'agir de pastilles de pré-production (granulés industriels) utilisées pour la fabrication de produits en plastique (Boucher & Friot 2020 ; Carbery *et al.* 2018). De nombreux taxons de différents niveaux trophiques et de stratégies alimentaires différentes interagissent alors avec ces macro-MP (Avio *et al.*, 2017). C'est le cas des filtreurs qui ont tendance à ingérer passivement des MP avec leur nourriture habituelle (Rist *et al.*, 2019). Cela a été démontré pour de nombreuses espèces aquatiques comme le zooplancton (Cole *et al.*, 2013), les bivalves (Santana *et al.*, 2016), les cirripèdes (Goldstein & Goodwin, 2013), et même les baleines filtrantes (Fossi *et al.*, 2016).

En plus des impacts multiples (*e.g.* physiologiques, physiques, chimiques ; Cole & Galloway, 2015), les MP sont capables d'adsorber les contaminants chimiques hydrophobes présents dans le milieu marin, notamment les pesticides (Frère, 2017). Cependant, la toxicité potentielle des MP et des pesticides, ainsi que leurs interactions à des concentrations environnementales sur les organismes aquatiques filtreurs des Pertuis Charentais, est à ce jour méconnue.

C'est dans ce contexte que le projet AQUAECOs (Figure 1 ; Amélioration de la QUALité Environnementale en zones conchylicoles des Pertuis Charentais) a été lancé pour caractériser la qualité chimique de l'environnement littoral des Pertuis Breton et d'Antioche vis-à-vis des phytosanitaires (pesticides) et des MP et déterminer leurs effets sur la santé des huîtres et des moules. L'objectif final de ce projet est de proposer des mesures d'atténuation des effets négatifs potentiels de ces contaminants sur la santé des bivalves en concertation avec les acteurs locaux et les professionnels de la filière conchylicole (représenté par le CRC 17). Ce projet répond à une problématique économique, environnementale et intégrée à travers un travail de recherche environnemental et expérimental en laboratoire. C'est le premier projet de recherche porté par le CRC 17 afin d'enclencher une dynamique de collaboration entre la recherche scientifique et les activités professionnelles maritimes aquacoles.



Figure 1. Logo élaboré pour le projet AQUAECOs.

Les deux espèces de bivalves étudiées, dans ce projet, sont la moule bleue (*Mytilus edulis*) et l'huître creuse (*Crassostrea gigas*). Ces deux espèces ont été choisies car elles représentent la grande majorité de la production conchylicole française (Gilbert *et al.*, 2014). De plus, ces espèces représentent à la fois des espèces sentinelles des écosystèmes (Amiard & Amiard-Triquet, 2008), c'est-à-dire capable d'alerter sur la contamination chimique des milieux, des espèces utiles au maintien et à l'amélioration des conditions biotiques et/ou abiotiques nécessaires à la richesse spécifique (Gutiérrez *et al.*, 2003). En tant qu'organismes filtreurs, et grâce à leurs résistances et réponses physiologiques à la modification des paramètres de leur habitat, ils sont considérés comme de bons bioindicateurs, en particulier, l'huître creuse, *Crassostrea gigas* (O'Connor, 2002), organisme modèle sélectionné durant cette étude de doctorat (Figure 2).

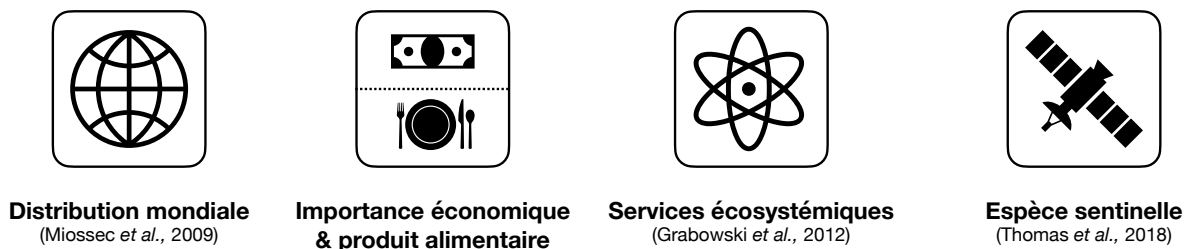


Figure 2. L'huître creuse, *Crassostrea gigas*, utilisé en tant que modèle d'étude expérimental.

Le projet AQUAECOs s'articule autour de deux volets :

- I. Un volet expérimental portant sur l'étude de la toxicité des MP et des pesticides (sélectionnés et détectés dans les Pertuis Charentais) sur le modèle huître creuse (*C. gigas*), à différents stades de vie (en conditions contrôlées de laboratoire).
- II. Un volet environnemental visant à caractériser la contamination du littoral des Pertuis Charentais (Sèvre Niortaise, Seudre et Charente) en pesticides et MP (eau, sédiments et biote) et leurs effets sur la santé des bivalves (huîtres creuses et moules bleues ; *C. gigas* et *M. edulis*) en zones conchylicoles.

Les travaux de thèse réalisés, s'intègrent directement dans le volet expérimental du projet AQUAECOs. Ce manuscrit de thèse est rédigé sous la forme d'une compilation d'articles scientifiques. L'étude proposée dans ce manuscrit, vise à mettre en place et à conduire des expérimentations en conditions contrôlées de laboratoire dans le but de comprendre la relation entre les traits biologiques des organismes et leurs réponses physiologiques face à une contamination

« environnementale ». Dans ce contexte, les huîtres creuses (*C. gigas*) ont été exposées à un polluant unique ou à un mélange de contaminants, représentatifs des Pertuis Charentais (Browne *et al.*, 2008 ; Gagnaire *et al.*, 2007 ; Luna-Acosta *et al.*, 2015). Par ailleurs, l'activité conchylicole est aujourd'hui menacée par les mortalités précoces de naissains d'huîtres creuses, en raison de menaces de plus en plus présentes (e.g. dégradation de la qualité des eaux, raréfaction de l'eau douce et augmentation des phénomènes climatiques extrêmes), qui entraînent une dégradation globale des conditions de production et d'élevage. Afin de mieux comprendre les relations entre mollusques bivalves et polluants, des expositions aux MP et pesticides ont été réalisées à différents stades de développement, stades précoces (embryons, larves-D), naissains et adultes en conditions contrôlées de laboratoire (Boukadida *et al.*, 2017 ; Gamain *et al.*, 2016 ; Mai *et al.*, 2012 ; Sussarellu *et al.*, 2016).

Pour ce faire, trois principaux volets ont été développés durant cette thèse :

Volet 1 : Étude préliminaire et évaluation des contaminations chimiques organiques (pesticides, microplastiques) dans les Pertuis Charentais.

- (i) Des données bibliographiques, des analyses comparatives (retour d'expérience au niveau régional, national et Européen), des données chimiques des 5 dernières années ont été collectées grâce au partenariat mis en place avec le laboratoire d'analyse Qualyse (La Rochelle, France). Ces différentes données ont été compilées dans le cadre du plan d'action conchylicole du Département 17 (Charente-Maritime). Grâce à ces données, un travail préliminaire a visé à cibler les pesticides d'intérêt (caractéristique de l'environnement des Pertuis Charentais) pour tester leur toxicité en laboratoire, sur l'huître creuse.
- (ii) De plus, une étude pilote a été réalisée sur un site littoral des Pertuis Charentais. Cette étude exploratoire visait à caractériser la contamination macro et MP d'une plage soumise aux activités ostréicoles. Les résultats de cette étude nous ont permis notamment de sélectionner les plastiques, d'origine ostréicoles, les plus présents dans l'environnement littoral local afin de les tester en conditions d'exposition contrôlées. Le contexte de pollution aux MP est assez mal connu au niveau local (Charente-Maritime, Sud-Ouest, France). Afin de compléter ces travaux, la démarche environnementale du projet AQUAECOs viendra consolider ces résultats, dans les échantillons d'eau, le biote et le sédiment, des compartiments non considérés dans l'étude expérimentale.

Volet 2 : Evaluation de l'impact des contaminants sur l'huître creuse (*Crassostrea gigas*).

Le volet 1 du projet a permis de définir les pesticides et MP d'intérêt pour les expérimentations. Comme illustré dans la Figure 3, des expositions ont été menées avec des contaminants commerciaux (pesticides et MP) et d'autres ont été conduites avec des MP « environnementaux » d'origine ostréicole, collectés dans les Pertuis Charentais afin d'être le plus représentatifs possible du secteur d'étude. Effectivement, l'utilisation de MP environnementaux a été peu explorée dans la communauté scientifique (Pannetier *et al.*, 2020 ; Le Bihanic *et al.*, 2020 ; Cormier *et al.*, 2021) ; cette démarche originale apparaît pertinente à entreprendre pour une meilleure compréhension des pollutions aux MP du milieu marin.

Plusieurs actions ont été menées au sein de ce volet (Figure 3). A la suite de plusieurs expérimentations de contamination chimique réalisées dans des conditions de laboratoire contrôlées, des marqueurs

physiologiques et comportementaux ont été mesurés à différents stades de développement chez huître creuse.

- (i) Un focus sur les stades précoces de développement a été entrepris, car les études précédentes ont documenté un stress chimique plus important chez les premiers stades de vie au contact de polluants (His *et al.*, 1999a, 1999b ; Mai *et al.*, 2012 ; Mottier *et al.*, 2013 ; Tallec *et al.*, 2018). Des expositions à des polluants chimiques de type MP et pesticides commerciaux ont été mises en place en laboratoire sur des stades embryolarvaires (test d'embryotoxicité pour observations/analyses au stade larve-D 24 h). Les tests d'embryotoxicité sont fréquemment utilisés dans les essais biologiques écotoxicologiques pour l'évaluation de la qualité de l'eau et de l'environnement marin. En effet, les jeunes stades de développement chez les organismes modèles « sentinelles », sont très sensibles aux polluants et apportent une réponse rapide.
- (ii) Par ailleurs, des expositions ont été effectuées sur le stade pédivéligrè, période cruciale de fixation larvaire, pour évaluer l'effet de MP environnementaux sur la survie et la métamorphose du naissain sur une période de 11 mois.
- (iii) Afin de comprendre les effets d'une exposition contrôlée aux MP et/ou aux herbicides commerciaux sur le comportement valvaire de l'huître creuse (*C. gigas*), une expérimentation a été conduite sur le stade naissain.
- (iv) Une démarche expérimentale, inspirée des travaux de Sussarellu *et al.* (2016), a permis de mettre en place, chez des huîtres creuses adultes, une exposition subchronique à un cocktail de MP d'origine ostréicole (PE, PP et PVC), ayant vieillis dans l'environnement marin. L'expérience de contamination chimique réalisée en laboratoire s'est déroulée durant la période de gamétogénèse des bivalves marins testés afin d'analyser les effets sur la génération larvaire.
- (v) En complément de ces expérimentations menées en conditions de laboratoire, des mesures de biomarqueurs (stress oxydant, activité Laccase, peroxydation lipidique) ont été réalisées sur les stades plus tardifs (naissain et adulte), au niveau de la glande digestive des bivalves ayant été exposés préalablement à des contaminants chimiques (*cf.* (iii) et (iv) ; stades tardifs) selon les techniques utilisées en routine au laboratoire LIENSs (Breitwieser *et al.*, 2016 ; 2018 ; 2020a, b ; Luna-Acosta *et al.*, 2017 ; Milinkovitch, 2011 ; Milinkovitch *et al.*, 2011a, b ; 2013 ; 2015a, b).

Volet 3 : Dialogue, concertation, transfert de connaissances et solutions de sortie de crise.

Les comités (de pilotage et technique) du projet AQUAECOs ont permis de présenter les travaux de recherche menés en partenariat entre l'UMR LIENSs à La Rochelle Université, le laboratoire EPOC à l'Université de Bordeaux et le Cedre de Brest. Les résultats obtenus dans les volets 1 et 2 étaient alors présentés aux acteurs et décideurs locaux, partenaires du projet AQUAECOs (*cf.* Financements & accompagnements). L'objectif final permettra, de manière concertée, l'établissement d'un plan de gestion pour une meilleure prospérité de la conchyliculture et ce, en considérant les enjeux socio-environnementaux des Pertuis Charentais.

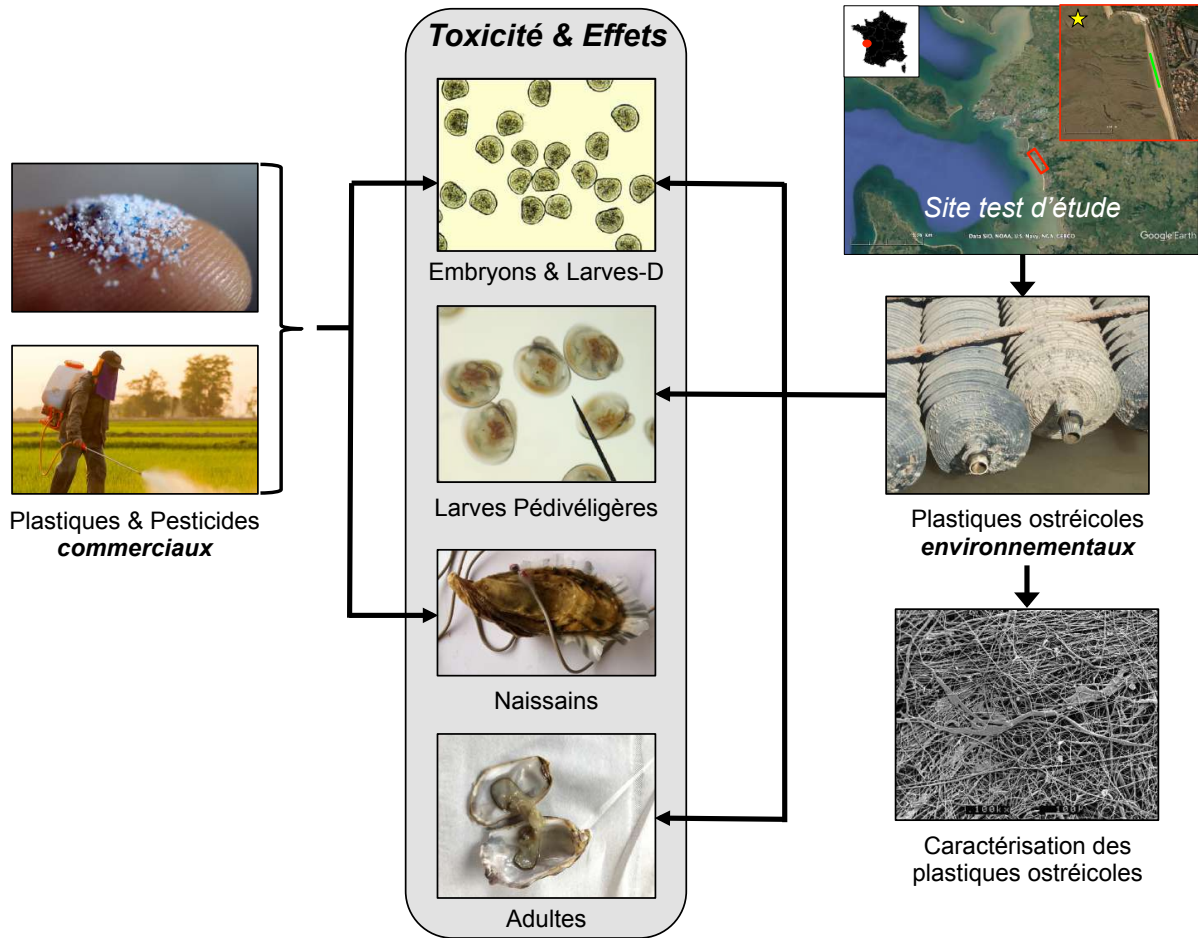


Figure 3. Expérimentations à différents stades de vie chez l'huître creuse (*Crassostrea gigas*), avec expositions aux MP et pesticides commerciaux ou environnementaux.

La démarche expérimentale de ce travail de thèse réside dans des approches pluridisciplinaires ciblant des expertises de domaines scientifiques complémentaires (*i.e.* écotoxicologie, biologie, physico-chimie...). Ce projet de thèse a pour objectif final de répondre aux attentes des conchyliculteurs et gestionnaires de l'environnement. Pour y parvenir, les actions de recherche mises en place s'articulent en trois objectifs principaux (Figure 4). Ces objectifs seront décrits dans ce présent manuscrit à travers plusieurs articles et argumentaires scientifiques.

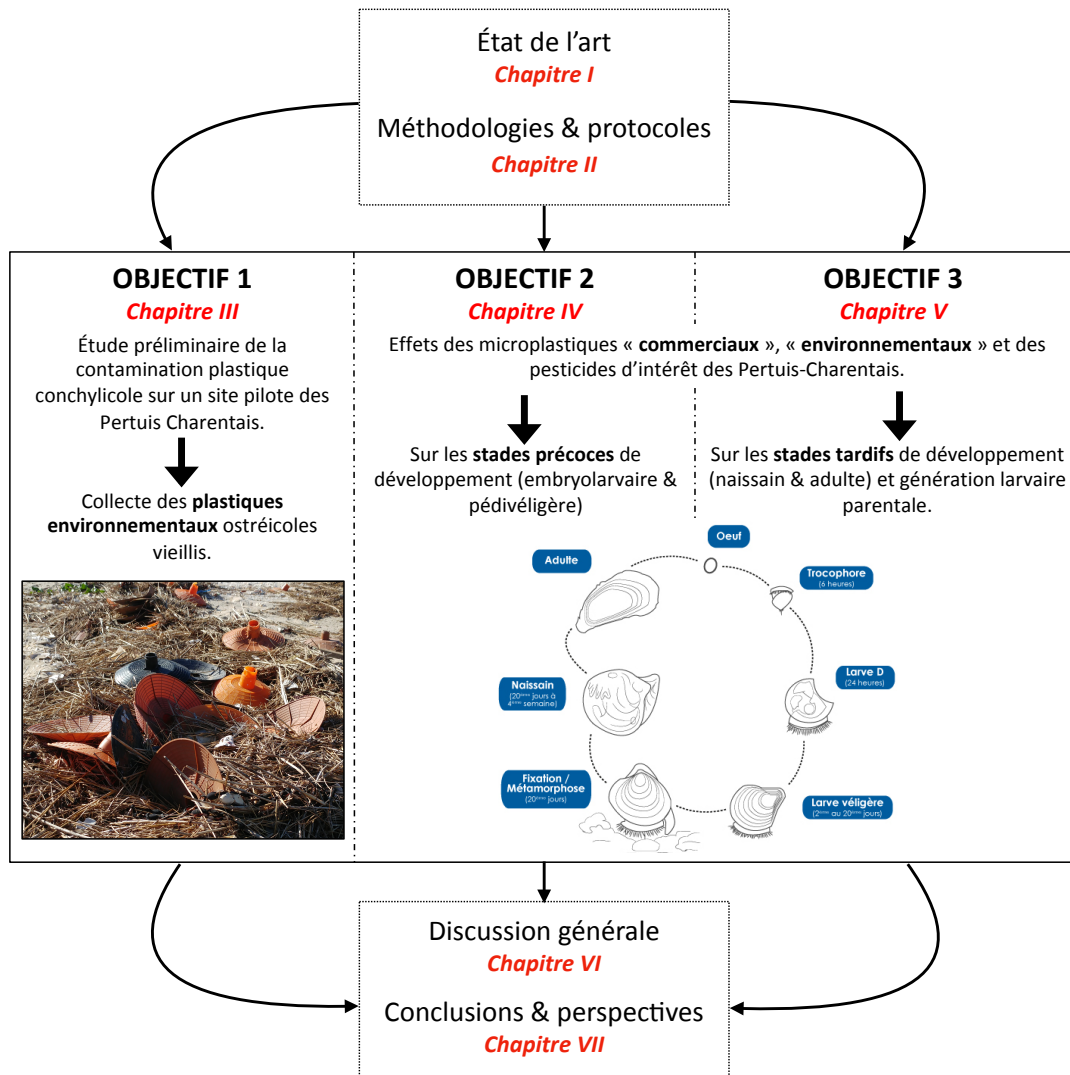


Figure 4. Schéma organisationnel récapitulant les différents objectifs décrits dans les chapitres du manuscrit de thèse.

Ainsi, pour répondre aux professionnels de la filière conchylicole quant aux enjeux socio-environnementaux de l'effet d'une pollution MP et/ou pesticides chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ce manuscrit de thèse se décline en 7 chapitres faisant suite à une brève introduction présentant les objectifs de la thèse :

- Le **Chapitre I** est consacré à la synthèse bibliographique des travaux de thèse, et permet de retracer les connaissances actuelles sur les thématiques scientifiques et socio-environnementales des Pertuis Charentais. Dans ce contexte, il est considéré (i) la zone géographique étudiée (Pertuis Charentais), en précisant les données économiques actuelles du secteur professionnel conchylicole ; (ii) le modèle biologique étudié, l'huître creuse, *C. gigas*, (iii) les familles de polluants chimiques (MP et pesticides) d'intérêt pour les professionnels de la filière conchylicole et leurs effets toxicologiques connus chez les mollusques bivalves marins.

- Le **Chapitre II** porte sur la démarche méthodologique mise en place dans l'étude expérimentale de la thèse en décrivant l'approche menée à différents stades de vie chez l'huître creuse, *C. gigas*. Les méthodes et équipements expérimentaux proposés pour la calibration et la validation de protocoles expérimentaux sont détaillés dans les publications scientifiques identifiant le caractère innovant de ces expériences menées en conditions contrôlées de laboratoire. Les méthodologies complémentaires sont présentées plus largement (embryotoxicité, valvométrie et structures de maintien des organismes à différents stades de vie) dans ce Chapitre II, afin d'apporter des détails et précisions supplémentaires par rapport aux descriptions effectuées dans les publications scientifiques.
- Le **Chapitre III** envisage une approche environnementale jamais décrite auparavant, sur un « site pilote » des Pertuis Charentais. Cette étude exploratoire a permis de collecter des échantillons et d'évaluer l'importance de la contamination par les plastiques conchylicoles. À proximité de concessions conchylicoles en activité et/ou de friches abandonnées, les plastiques ont été identifiés et caractérisés. De plus, un protocole d'échantillonnage a été mis en place dans les sédiments sableux de la plage pilote. Puis des analyses ont été réalisées afin d'identifier les MP présents (*e.g.* nature, taille). Les additifs de phtalates et HAP présents à la surface des plastiques ostréicoles, ont été identifiés, avec le soutien du Cedre de Brest. Des données complémentaires, issues du volet environnemental du projet AQUAECOs seront apportés pour enrichir les résultats de teneurs en MP obtenues lors de campagnes d'échantillonnage AQUAECOs 2020 et 2021 réalisées dans les Pertuis Charentais (Lerebours, 2021, *cf.* Annexe 2).
- Le **Chapitre IV** inclus plusieurs articles scientifiques portant sur les premières expérimentations réalisées aux stades précoces de développement chez les mollusques bivalves marins, dans le but de décrire les effets des MP (commerciaux et environnementaux) et pesticides commerciaux sur plusieurs stades de vie (stade embryo-larvaire, larve-D et pédivéligère) chez l'huître creuse (*C. gigas*).
- Le **Chapitre V** présente les résultats originaux portant sur les effets des MP (commerciaux et environnementaux) et pesticides commerciaux observés à des stades plus tardifs de développement (naissain, adulte et intergénérationnel). Les données expérimentales collectées sur les stades tardifs de développement sont novatrices et peu décrites dans la littérature pour le modèle huître creuse (*i.e.* comportement valvaire sur les naissains et effets intergénérationnels des adultes).
- Pour finir, les **Chapitres VI et VII** offrent une discussion de ces travaux de thèse ainsi que les conclusions/perspectives futures pour une meilleure gestion de la qualité des eaux des Pertuis Charentais.

CHAPITRE I – État de l’art

A. La conchyliculture sur le territoire des Pertuis Charentais

1. Les Pertuis Charentais
 - 1.1 *Caractéristiques générales*
 - 1.2 *Les données environnementales*
 - 1.3 *L’urbanisation*
2. Contexte historique de la conchyliculture Charentaise
 - 2.1 *La naissance de la conchyliculture jusqu’aux années 2000*
 - 2.2 *Les crises de mortalités et le contexte actuel de la conchyliculture*
3. Les enjeux socio-économiques
 - 3.1 *L’activités conchylicole*
 - 3.1.1 *L’importance des bivalves en France*
 - 3.1.2 *L’économie conchylicole dans les Pertuis Charentais*
 - 3.2 *Les activités agricoles dans les Pertuis Charentais*

B. Modèle biologique : l’huître creuse (*Crassostrea gigas*)

1. Présentation de l’huître creuse
2. Les méthodes de production
3. L’habitat et l’aire de répartition
4. L’anatomie et la nutrition
5. La reproduction et le cycle de vie
 - 5.1 *La gamétogénèse, ponte et fécondation*
 - 5.2 *Les stades larvaires*
6. L’intérêt écotoxicologique de l’huître creuse

C. Les contaminants testés en conditions expérimentales

1. Les microplastiques
 - 1.1 *La production et l’industrialisation des plastiques*
 - 1.2 *La pollution par les plastiques dans les écosystèmes marins*
 - 1.3 *Les microplastiques : origine et devenir*
 - 1.4 *Les conséquences des microplastiques sur les écosystèmes marins*
 - 1.5 *Les impacts des microplastiques sur l’huître creuse (*C. gigas*)*
 - 1.6 *Les plastiques utilisés en aquaculture*
2. Les substances phytosanitaires : les pesticides
 - 2.1 *Généralités*
 - 2.2 *Les pesticides des Pertuis Charentais*
 - 2.2.1 *Pesticides et ostréiculture*
 - 2.2.2 *Les réseaux de surveillance et suivis de pesticides*
 - 2.2.3 *Les pesticides d’intérêt de cette étude*
 - 2.3 *Les effets des pesticides sur les modèles d’étude aquatiques*
 - 2.3.1 *Les effets des pesticides d’intérêt de cette étude sur les organismes aquatiques*
 - 2.3.2 *Les effets écotoxicologiques sur les stades précoces de développement, chez l’huître creuse (*C. gigas*)*
 - 2.3.3 *Processus de vectorisation des pesticides sur les plastiques*

Une synthèse bibliographique (état de l’art) a été réalisée afin de synthétiser les différentes connaissances acquises sur les différents objets d’étude de cette thèse. Tout d’abord, une présentation du secteur d’étude est proposée, avec l’importance économique des Pertuis Charentais en conchyliculture et le contexte environnemental actuel. Le modèle d’étude, l’huître creuse (*C. gigas*) est ensuite présenté en identifiant les différentes phases de son cycle de vie (fécondation & stades larvaires et naissains). Pour finir, les deux classes de polluants (MP et pesticides) testés dans cette étude, sont développés. Le contexte actuel de contamination sera présenté ainsi que les différentes études scientifiques ayant montré des résultats majeurs sur les effets toxiques de ces contaminants émergents.

A. La conchyliculture sur le territoire des Pertuis Charentais

1. Les Pertuis Charentais

1.1 Caractéristiques générales

Par définition, les pertuis, sont des zones maritimes abritées et délimitées par une ou plusieurs îles et un continent. Les Pertuis Charentais, quant à eux, sont situés dans la région de La Rochelle, dans le département de la Charente-Maritime, sur la façade sud-ouest de l’Atlantique à l’intersection des régions Pays de la Loire et Nouvelle-Aquitaine. La mer des Pertuis Charentais comprend un ensemble de trois Pertuis : le Pertuis Breton, le Pertuis d’Antioche et le Pertuis de Maumusson. Les Pertuis Charentais abritent une grande variété d’habitats naturels côtiers présentant pour certains d’entre eux des phénomènes très actifs d’érosion ou de sédimentation. Certains de ces habitats sont particulièrement riches et productifs car ils constituent les réceptacles des eaux de trois principaux fleuves (Figure 5 ; Mille & Le Moine, 2011) :

- ⇒ La Sèvre Niortaise, au nord (159 km de long), qui alimente le Pertuis Breton.
- ⇒ La Charente, au centre (360 km de long avec un bassin versant de 10 500 km²) favorable au développement de la conchyliculture et de la pêche dans le Pertuis d’Antioche.
- ⇒ La Seudre, au sud (bassin versant de 200 km²), qui s’écoule dans un bras de mer de 20 km de long puis dans le Pertuis d’Antioche. Son débit est quasi nul en période estivale.

A certaines périodes de l’année (printemps/automne ; Froidefond *et al.*, 1998), le panache de la Gironde peut aussi remonter jusque dans les eaux des Pertuis Charentais en faisant le tour de l’île d’Oléron ou *via* le Pertuis de Maumusson. La Charente-Maritime possède un littoral de 470 km de côtes réparties sur 61 communes. En janvier 2015 la population était de 640 000 habitants avec une densité de 92 habitants/km² (Garçon, 2016).

La Mer des Pertuis Charentais et ses espaces littoraux ont l’avantage de rassembler dans une même région :

- ⇒ une grande variété de faciès naturels côtiers présentant pour certains d’entre eux des phénomènes d’érosion ou de sédimentation actifs ;
- ⇒ de fortes imbrications d’unités paysagères littorales ;
- ⇒ des milieux particulièrement riches et productifs, d’intérêt aquacole de tout premier plan, mais aussi d’intérêts touristiques et écologiques majeurs (Biais *et al.*, 2004).

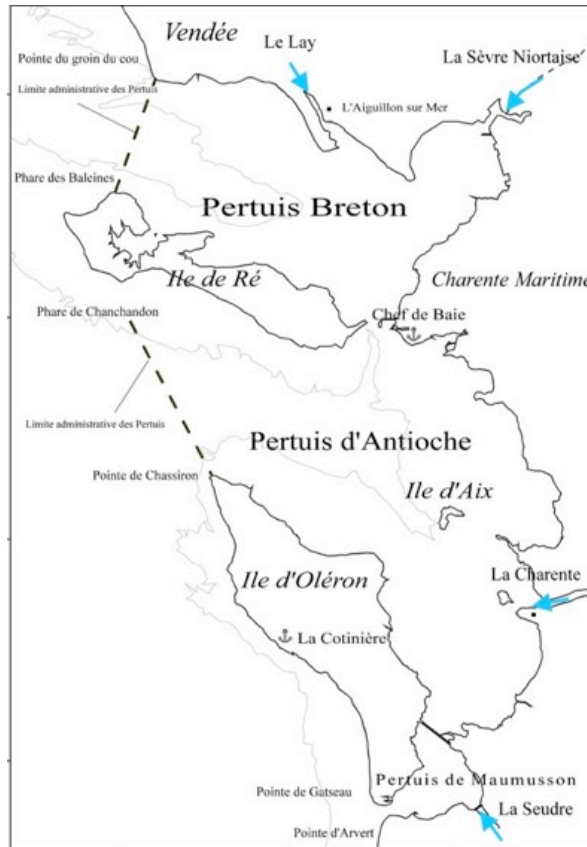


Figure 5. Carte des Pertuis Charentais, avec ses principaux fleuves, s’y déversant. D’après les travaux de Moussard, 1998.

Les Pertuis Charentais sont caractérisés par un faible hydrodynamisme, rythmé par les marées et le panache des différents fleuves qui s’y jettent (Schillinger, 1996 ; Le Hir *et al.*, 2010). Le bassin, des Pertuis Charentais, présente une faible bathymétrie avec une surface d’estran majoritaire (zone périodiquement recouverte par les marées). Le climat est de type océanique avec des précipitations moyennes de 800 mm.an^{-1} (Mille & Le Moine, 2011).

Les Pertuis Charentais étant l’exutoire de trois principaux fleuves, il est important de ne pas négliger les apports en matière de ces fleuves. En France, depuis les années 1970, les pollutions d’origine industrielles ont fortement diminué en raison de la désindustrialisation (Bost & Messaoudi, 2017), mais également grâce aux efforts consentis par les industriels et les communes sous le contrôle des agences de l’eau (Tiberghien, 2012). De plus, la Charente-Maritime n’est pas le département le plus fortement industrialisé (Bry & Hoflack, 2004). Cependant, bien qu’elles soient aujourd’hui faibles, les industries rejettent des micropolluants potentiellement toxiques, persistants et bioaccumulés par les organismes (Rostagno *et al.*, 1999). Les principaux polluants sont des éléments traces métalliques (*e.g.* l’arsenic, le cadmium, le chrome, le cuivre, le mercure, le plomb et le zinc), des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), des polychlorobiphényles (PCB), mais aussi des substances phytosanitaires (pesticides) et potentiellement des particules de plastiques sous leurs formes micro et/ou nano (MP/NP). Du fait de leur fabrication et de leur utilisation, les MP/NP pénètrent dans le milieu marin par entrée directe, à travers les rivières, le ruissellement du sol et les composants des effluents industriels, urbains, agricoles et domestiques (*e.g.* stations d’épuration, véhicule à moteur, etc., Derraik, 2002 ; Fendall and Sewell, 2009 ; Galgani *et al.*, 2013a).

1.2 Les données environnementales

Les Pertuis Charentais sont représentés par des zones côtières abritées des îles (île de Ré, Oléron, Aix et Madame), peu profondes avec d’importantes surfaces d’estran. La nature des fonds marins, sur ce secteur, est hétérogène, proposant une colonisation par différents habitats marins riches en biodiversité : estrans rocheux (Soletchnik *et al.*, 2012), vastes vasières (De Montaudouin & Sauriau, 2000), récifs d’hermelles (Cajeri *et al.*, 2012) et herbiers de zoostères (Aubert *et al.*, 2019). Ces habitats et milieux marins jouent un rôle essentiel pour la vie marine, comme les vasières, qui jouent le rôle de garde-manger, d’habitat et d’abri, de lieux de frayère et de nourricerie (Lavergne, 2014). Ces zones, si particulières, participent à la formation de fines pellicules de phytoplancton, se développant à leur surface, et qui est à la base de l’alimentation (Underwood & Kromkamp, 1999) pour de nombreuses espèces présentes sur ce secteur (poissons, crustacés, mollusques, oiseaux, ...). De plus, les trois grands fleuves (Sèvre Niortaise, Charente et Seudre) apportent des nutriments essentiels au développement des blooms phytoplanctoniques, donnant lieu à de forts regroupements de poissons et autres espèces. Une grande diversité d’activités humaines dépend de ces ressources sur ce secteur géographique bien précis, liée à la forte productivité biologique qui s’y développe. Tous ces éléments font des Pertuis Charentais, un territoire à préserver. Par exemple, dans sa configuration actuelle, les Pertuis Charentais ont un rôle essentiel (*i.e.* Zone Natura 2000), vis-à-vis de la conservation de l’esturgeon européen (*Acipenser sturio*), qui vient migrer entre l’île de Ré et Oléron.

En 2014, le site des Pertuis Charentais devient donc une zone de conservation d’intérêt classée Natura 2000. De plus, les Pertuis Charentais, constituent une mosaïque d’habitats très riches et cruciaux pour de nombreuses espèces d’oiseaux migrateurs (Bocher *et al.*, 2007 ; Saint-Béat *et al.*, 2013).

Les Pertuis Charentais sont donc localisés à l’interface entre le milieu terrestre et le milieu océanique et les facteurs de vulnérabilité sont nombreux et d’origines diverses :

- pollutions marines par les macrodéchets ou micropolluants : hydrocarbures, pesticides, métaux, plastiques, eaux usées domestiques, résidus pharmaceutiques, additifs (*e.g.* antifouling), engrais ... ;
- dégradation physique des fonds par les activités portuaires (comme le dragage) et de pêche intensive;
- activités de loisirs et tourisme de masse en période saisonnière.

Les cours d’eaux sont aujourd’hui majoritairement influencés par les pollutions diffuses d’origine agricoles, notamment par les engrais (phosphates, nitrates) et différents produits phytosanitaires (Soulard, 2005 ; Rousseau & Guyard, 2014). Le lien entre la dégradation des écosystèmes littoraux, les flux d’azote et l’agriculture a été établi dans de nombreuses études scientifiques (Gruber & Galloway, 2008 ; Conley *et al.*, 2009 ; Howarth *et al.*, 2011). L’agriculture, par nature consommatrice de nutriments, est mise en cause : son objectif est de produire, à l’aide d’apports nutritifs, de la biomasse végétale et animale pour nourrir les Hommes. Ces apports sont le plus souvent utilisés sous forme minérale d’azote, de phosphore ou de potassium. Ces apports d’engrais dans les fleuves et au niveau du littoral dus au ruissellement peuvent provoquer des blooms phytoplanctoniques (Beman *et al.*, 2005), correspondant à une augmentation importante et soudaine de phytoplancton. L’augmentation de la concentration de ces algues peut provoquer d’une part une diminution de l’oxygène dissous dans le milieu, pouvant potentiellement engendrer une anoxie du système (Rabalais *et al.*, 2009) et ainsi causer la mort de tous les autres organismes aérobies. D’autre part, la prolifération de certaines espèces planctoniques (*e.g.* cyanobactéries, dinoflagellés) capables de libérer des toxines (Carmichael, 1994) peuvent impacter le fonctionnement des écosystèmes notamment des perturbations

des relations entre organismes, des changements de la biodiversité ou des conditions de luminosité (Bláha *et al.*, 2009).

Outre ces différentes sources de pollutions des cours d’eau, et par conséquent du littoral, d’autres situations ponctuelles peuvent altérer la qualité du milieu, comme les fortes pluies provoquant un ruissellement des eaux résiduaires urbaines et le déversement des eaux usées non traitées directement dans le milieu naturel. Afin de permettre un traitement efficace des eaux usées, les stations d’épuration se dotent de dégrilleurs à maille de plus en plus fines, susceptibles de retenir plus d’éléments dont les plastiques, mais il n’y a pas de prise en compte des MP à l’heure actuelle (Marek *et al.*, 2020), même si certains projets sont en cours pour tenter d’améliorer les techniques de filtration et de traitement.

Par ailleurs, l’activité portuaire des Pertuis Charentais (six ports de plaisance, trois ports de pêche et le grand port de commerce) peut représenter également une source de pollution chimique en plus des pollutions d’origine tellurique. Les infrastructures nécessaires à la bonne organisation de ces activités entraînent des modifications physiques, chimiques et biologiques du milieu. Les Pertuis Charentais étant des zones propices à la sédimentation, de nombreux dragages sont nécessaires, et effectués de manière régulière afin d’éviter l’envasement des ports et des chenaux. Les sédiments dragués et remis en suspension pourraient avoir un impact sur les écosystèmes côtiers, et plus largement sur la qualité de l’eau, en entraînant la remise en suspension d’éléments toxiques persistants comme ceux cités précédemment (*e.g.* métaux, HAP, pesticides, MP). De la même façon, les travaux d’aménagements et l’entretien des ports et voies de navigation (*e.g.* déroctage, dragage, clapage des sédiments) pourraient avoir des impacts sur la qualité des eaux littorales lors de la remise en suspension des sédiments (par exemple en modifiant la courantologie ou en recouvrant les fonds marins représentant les habitats de certaines espèces benthiques ; Choblet, 2005 ; Huguet, 2019).

Outre ces pollutions pouvant altérer le littoral, les conditions de rencontre entre eaux saumâtres et eaux douces entraînent une forte production biologique (Marteil, 1979 ; Lebreton *et al.*, 2019), faisant des Pertuis Charentais une zone idéale pour la reproduction d’espèces marines, tel que les bivalves.

1.3 L’urbanisation

Le département de la Charente-Maritime est considéré comme le troisième département le plus attractif de France, après les départements des Landes et la Gironde, mais aussi le quatrième plus âgé. Le vieillissement est accentué par une forte proportion de personnes âgées de 40-64 ans alors qu’une part importante des 18-29 ans quitte le territoire. D’une superficie de 6 864 km², la Charente-Maritime occupe 8 % du territoire total de la région Nouvelle-Aquitaine. En 2015, on dénombre 639 600 habitants en Charente-Maritime, soit 11 % de la population de la région Nouvelle-Aquitaine. Entre 2008 et 2015, la population a augmenté chaque année de 0,6 % en moyenne. C’est l’une des croissances les plus fortes, derrière les Landes et la Gironde (Garçon, 2016 ; Grapin, 2017).

La commune de La Rochelle située sur la façade atlantique, est le chef-lieu du département de la Charente-Maritime. En 2008, c’était la deuxième commune de l’ancienne région Poitou-Charentes, avec environ 76 000 habitants. À La Rochelle, les années 1990 ont vu la naissance de l’Université, du TGV (Sncf et Alstom) ainsi que l’aménagement du Port Atlantique, dans un contexte d’attractivité croissante de la façade atlantique. Entre 1990 et 2008, l’emploi se développe alors plus vite à La Rochelle avec un gain de 34 %, contre 25 % dans le référentiel « Sun Belt ». En adaptant cette notion à la France, les régions attractives de l’Ouest et du Sud de la métropole forment une «Sun Belt» à la française (Borély & Bono, 2012). Le dynamisme, tant économique que démographique, est toujours à

l’œuvre aujourd’hui au niveau de La Rochelle (Borély & Bono, 2012). Fin 2019, la communauté d’agglomération de La Rochelle se présente en tant que porteur sur un projet de territoire zéro carbone avec pour objectif l’atteinte de la neutralité carbone d’ici 2040. La Rochelle se positionne donc comme le premier littoral urbain pour parvenir à un bilan zéro carbone et vers une ville durable partageant un système économique circulaire.

2. Contexte historique de la conchyliculture Charentaise

2.1 La naissance de la conchyliculture jusqu’au année 2000

L’huître plate (*Ostrea edulis*) disparut totalement du Bassin de Marennes-Oléron, dans les années 1925 (Toulhoat, 2008). On considère que l’huître portugaise (*Crassostrea angulata*), quant à elle, a survécu jusque dans les années 1970 où les modes traditionnels de production et de commercialisation ont été bouleversés, dans le Bassin de Marennes-Oléron et le secteur des Pertuis Charentais. Marqués par la crise économique de 1970 (diminution massive de *C. angulata*), les ostréiculteurs alors spécialisés dans l’une des phases de production ostréicole, furent contraints de diversifier leurs activités. Le cycle de production fut bouleversé durant deux à trois ans à cause de la mortalité des huîtres portugaises. A l’époque, les ostréiculteurs furent alors contraints d’effectuer leur captage eux-mêmes, afin de régénérer les stocks d’huîtres (*C. angulata*).

La conchyliculture (activités ostréicoles et mytilicoles) française se classe au deuxième rang européen, avec une production moyenne de 200 000 tonnes de coquillages chaque année (60 % de cette production étant représenté par l’ostréiculture). La Charente-Maritime est le premier département conchylicole français, notamment en termes d’emploi : il comprenait 1/3 des entreprises conchylicoles françaises recensées en 2001. Ces entreprises sont localisées à proximité du Pertuis Breton, notamment en baie de l’Aiguillon ainsi que dans le secteur de l’Île de Ré et du Pertuis d’Antioche. Les plus nombreuses sont installées au sud du département, dans le bassin de Marennes-Oléron.

La quasi-totalité des entreprises présentent en Charente-Maritime (85 % des entreprises), produisent des huîtres. Les espèces d’huîtres produites sont l’huître creuse (*Crassostrea gigas*) en majorité, ainsi que l’huître plate (*Ostrea edulis*), cette dernière ne représentant que 1,5 % des huîtres produites en 2001 et sa production étant confinée aux secteurs de la Bretagne et de l’Aquitaine dans une moindre mesure. Globalement, l’ostréiculture française est donc dominée par la production d’huîtres creuses. Dans le département de Charente-Maritime, le mode de culture ostréicole le plus répandu, est la culture en surélevé (5 ha/exploitation, en 2001). Par ailleurs, il faut noter qu’en Charente-Maritime, 40 % du foncier détenu appartient au domaine privé (claires d’affinage dans les marais).

Apparues en Europe et aux États-Unis dans les années 1960 (FAO, 2006), les éclosiers de bivalves et notamment de naissains d’huîtres creuses permettent de produire des huîtres sélectionnées génétiquement, en bassins clos et conditions contrôlées, grâce à la maîtrise des phases de gamétogénèse/reproduction. Les éclosiers ont progressivement suppléé l’approvisionnement en naissain, jusqu’alors uniquement exécuté par le captage naturel en mer. Popularisé beaucoup plus tard qu’aux États-Unis, le recours au naissain d’éclosier est aujourd’hui en augmentation progressive en France : il était de 15 % en 2000 (Agreste, 2005), mais certains professionnels estiment qu’il pourrait représenter presque la moitié de l’approvisionnement aujourd’hui. Le télécaptage, mode de production plus marginal, représentait moins de 1 % de la production de naissain en 2000. Le télécaptage est une technique qui permet à l’ostréiculteur de réaliser un captage artificiel en bassin clos (avec le matériel

adapté), à partir de larves d’huîtres d’écloseries prêtes à se fixer et à se métamorphoser en naissain (larves pédivéligères). La production de naissain en écloserie et le télécaptage ont ainsi l’avantage de permettre une obtention de naissains sur presque toute l’année, garantissant, de plus, un approvisionnement indépendant des fluctuations annuelles saisonnières.

Nous avons pu voir que, l’ostréiculture à Marennes-Oléron, du fait de son développement, a été confrontée à de nombreuses difficultés au cours du vingtième siècle (Héral, 1986 ; Héral *et al.*, 1986).

2.2 Les crises de mortalités et le contexte actuel de la conchyliculture

Entre mai et juin 2007, les températures des eaux marines ont augmenté de 5 °C en 10 jours et ont donc affectées les huîtres naissains et le demi-élevage (avec des mortalités > 30 % ; Pichot & Barret, 2007). Ces seuils de mortalités n’ont rien montré d’inquiétant du fait que les moyennes annuelles de mortalités sur les naissains se situaient aux alentours de 45 % entre 1994 et 2007 (Pépin *et al.*, 2014 ; Soletchnik *et al.*, 2008). En 2008, la crise de mortalité des naissains de l’espèce *Crassostrea gigas* s’est avérée être la plus importante depuis son introduction en France dans les années 1970.

Les caractéristiques de ces crises de mortalités sont :

- (i) une ampleur, sans précédent. Tous les bassins ostréicoles voient disparaître entre 75 et 100 % de leurs stocks de naissains/juvéniles ;
- (ii) elles touchent principalement le naissain (< 18 mois), toutes origines confondues (captage naturel ou écloserie, ploïdie 2N ou 3N) ;
- (iii) elles apparaissent de façon quasi-simultanée sur l’ensemble des façades maritimes françaises et dans des écosystèmes très variés (OIE, 2008 ; François *et al.*, 2009).

L’analyse régionale des données des mortalités issues du CREEA (Centre Régional d’Expérimentation et d’Application Aquacole, *i.e.* CAPENA depuis 1^{er} janvier 2021), montre que :

- (i) les mortalités de naissains sont plus importantes que chez les adultes ;
- (ii) le Pertuis Breton et le Pertuis d’Antioche subissent moins de mortalité que le Bassin de Marennes-Oléron.

Le virus OsHV-1 a été détecté, dès 2008, en particulier sous la forme d’un variant génotypique, appelé μ Var pour « microvariant » (Pépin *et al.*, 2008 ; Segarra *et al.*, 2010). Il est considéré comme l’agent étiologique majeur des épisodes de mortalité de naissain.

Dans les Pertuis Charentais, le niveau moyen de mortalité des naissains de captage est compris entre 60 et 85 % entre 2008 et 2017. Quelles que soient les années, un pic majeur de mortalité est observé courant mai ou début juin. Cette mortalité est souvent détectée, d’abord en Seudre (en lien probablement avec l’élévation de la température et une baisse de l’hydrodynamisme) pour être ensuite rapportée, dans les jours qui suivent, dans les autres sites de production des Pertuis (Soletchnik *et al.*, 2018). Les données du CREEA nous donnent une moyenne de mortalité de 69,8 % entre les années 2008 et 2019 sur les naissains de première année. En Septembre 2020, la mortalité relevée sur les naissains de première année est de 53 %, soit en dessous des moyennes observées ces dernières années. On retrouve une mortalité moyenne de 14-15 % pour les huîtres adultes de 2 et 3 ans (CREEA, 2020).

Les environnements littoraux sont des espaces attractifs soumis à de nombreuses pressions. Ils concentrent des activités humaines économiques et récréatives pouvant impacter la qualité des eaux littorales. Ces masses d’eau peu profondes et proches de la ligne de côte sont influencées à la fois par la terre et par la mer et sont particulièrement exposées aux pollutions. Les atteintes à la qualité de l’eau peuvent être d’origine marine, mais sont surtout terrestre : 80 % des polluants retrouvés dans l’océan proviennent du continent (Horton *et al.*, 2017). Des crises répétées, en particulier dans le domaine de la conchyliculture, suscitent des interrogations de plus en plus fréquentes à propos de la qualité des eaux littorales.

Malgré une qualité écologique des masses d’eaux des Pertuis Charentais jugée « bonne » au titre de la Directive Cadre pour l’Eau (DCE), les conchyliculteurs charentais font face à des taux élevés de mortalité de leurs coquillages depuis 2008 (Polsenaere *et al.*, 2017 ; Pépin *et al.*, 2017). Plusieurs décrets ont été mis en place afin de limiter la production et la consommation de produits conchylicoles et restreindre la baignade (cas de la Baie d’Aytré, La Rochelle, Charente-Maritime). Face à ces cas de pollutions des eaux littorales dans les Pertuis Charentais, il convient d’améliorer la gestion de la qualité des eaux littorales et d’y impliquer les acteurs locaux. Outre les conséquences environnementales d’une dégradation de la qualité de l’eau, de multiples usages et activités sont impactés. Les produits de la conchyliculture et de la pêche, filières d’importance pour l’économie maritime, dépendent directement de la qualité des eaux littorales.

Thème 1 : Rapport à l’environnement des professionnels des bassins versants

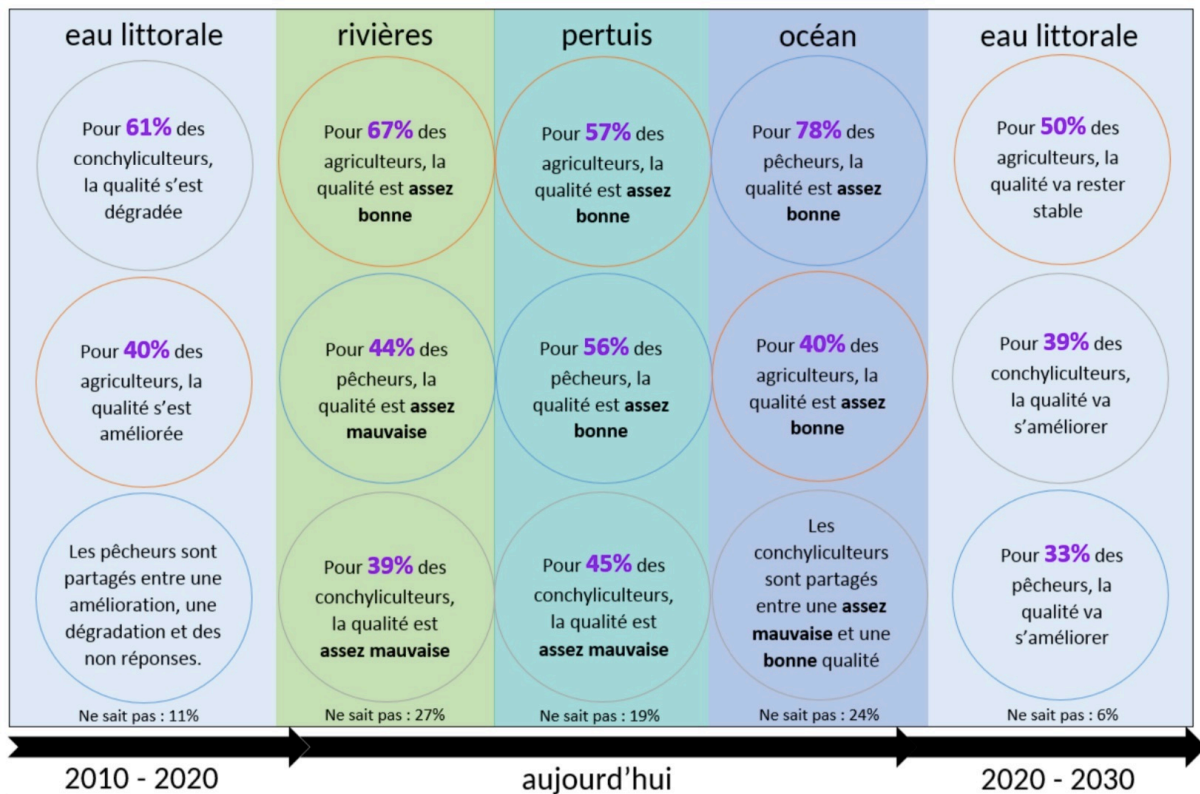


Figure 6. Résultats d’enquêtes sur la qualité des eaux observés par les principaux professionnels en relation avec les eaux littorales des Pertuis Charentais. D’après les résultats du projet LITTOPEC (Benitez & Bello, 2020).

Le littoral du Pertuis Charentais, haut lieu européen de la conchyliculture est dépendant de la qualité des eaux littorales par la physiologie et les contraintes d’élevage des espèces de coquillages. Les

productions annuelles sont fortement impactées par la dégradation des eaux littorales, ce qui constitue une des préoccupations majeures des professionnels de la filière. La qualité de l’eau devient alors un double enjeu de recherche, interdisciplinaire, entre analyse scientifique de la qualité des eaux, et analyse des politiques publiques présentes sur le territoire, spécifiques à la gestion des eaux littorales. L’articulation des concepts et outils issus de différentes disciplines permet d’analyser les enjeux de la qualité de l’eau dans les Pertuis Charentais au travers de différents spectres, en essayant de dépasser la vision unique des différents acteurs concernés. Dans le cadre de projets de recherche menés en parallèle du projet AQUAECOs, des enquêtes ont été menées sur les appréciations et ressentis des professionnels du monde maritime (projets LIENSs EVOLPEC, FEAMP LITTOPEC, 2019-2021). La Figure 6 présente les principaux résultats de ces enquêtes. Les ostréiculteurs semblent observer une qualité des eaux dégradée, depuis 2010 jusqu’à aujourd’hui.

3. *Les enjeux socio-économiques*

La filière conchylicole en Charente-Maritime est une activité très structurante qui façonne les territoires à terre et en mer et qui participe à l'identité du département.

En plus de l’activité conchylicole, deux autres activités économiques sont dominantes en Charente-Maritime, à savoir l’agriculture et le tourisme. En effet, la Charente-Maritime est la seconde destination en France Métropolitaine en 2018 (DGE, 2019 ; Figure 7). L’arrière-pays est souvent occupé par une agriculture céréalière intensive. En effet, l’agriculture fait également partie intégrante du paysage charentais, notamment avec des grandes cultures de blé, maïs, tournesol et vignes (Marot, 2011). Le littoral de la Charente-Maritime est également apprécié par de nombreux touristes. Le département propose de nombreuses infrastructures et devient un lieu de villégiature privilégié pour un tourisme familial. La troisième activité économique de Charente-Maritime est donc l’activité touristique qui est majoritairement représentée par le tourisme saisonnier. Les vacanciers viennent en nombre pour découvrir les grandes plages et la grande biodiversité qu’offrent les côtes de Charente-Maritime (Bouba-Olga *et al.*, 2006). Ces différentes activités cohabitent sur ce territoire et les pressions s’accumulent, au même titre que les usages s’intensifient. C’est ainsi que cet espace est connu pour ses nombreux conflits d’usages, entre agriculteurs, plaisanciers et ostréiculteurs notamment (Bossuet & Boutry, 2012 ; Candau *et al.*, 2012). Ici, la proximité spatiale entre différents acteurs présents sur ce même territoire donne lieu à l’apparition de conflits, notamment dû au manque de coordination entre usagers (Torre & Caron, 2005). La Charente-Maritime bénéficie donc d'une frange littorale très convoitée par de nombreuses activités professionnelles, économiques et récréatives.

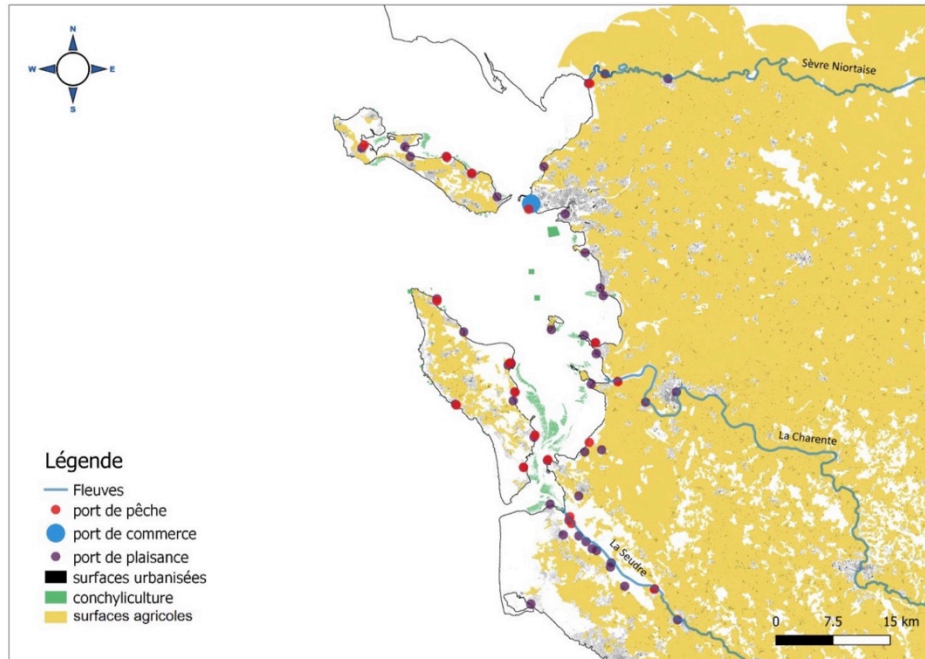


Figure 7. Représentation des activités économiques des Pertuis Charentais. D’après les travaux d’Alice Bello (programme LITTOPEC, 2019-2020).

3.1 L’activité conchylicole

3.1.1 L’importance des mollusques bivalves marins en France

Les bivalves représentent une ressource marine économique significative en France. En 2010 la production mondiale ostréicole de *C. gigas* (huître creuse) a été évaluée à 660 000 tonnes et celle de *M. edulis* (moule bleue) à 210 000 tonnes (FAO, 2012). L’huître creuse, représente 93 % du marché ostréicole mondial et 98 % du marché français. En 2006, les entreprises conchylicoles françaises commercialisaient 116 150 tonnes d’huîtres creuses. Alors que la France était classée comme le premier producteur et exportateur d’huîtres en Europe jusqu’en 2008, des phénomènes de mortalité ont entraîné une diminution de la production française qui est passée de 130 000 tonnes en moyenne jusqu’en 2009, à 80 000 tonnes sur les années 2010 et 2011 (CNC, 2020). Comprendre les causes de ce phénomène de mortalité représente un enjeu important pour la profession. Les contaminations aux MP et polluants constituent une piste de recherche sur le sujet. En effet, l’élevage des bivalves en mer ne permet pas de les isoler des différents contaminants et polluants présents dans les eaux marines. Ainsi ces systèmes de cultures sont exposés à la présence de MP, mais également de pesticides, de métaux lourds et autres contaminants d’origine anthropique (Van Cauwenberghe & Janssen, 2014). La concentration des MP dans les eaux est très variable et leur impact sur l’élevage est mal évalué. Leurs effets peuvent être indépendants ou cumulés par les effets « cocktails » d’autres contaminants (Thompson *et al.*, 2004).

Au niveau mondial, la France occupe la quatrième place, derrière la Chine (près de 3,9 millions de tonnes), la Corée (plus de 280 000 tonnes) et le Japon (un peu plus de 200 000 tonnes) (FAO, 2008). La France exporte des huîtres en Europe (vers l’Italie pour plus de la moitié), mais elle en importe également (Irlande, Royaume-Uni...). En comparaison, la balance commerciale française est très déficitaire pour les moules, qui sont importées en grande quantité d’autres pays d’Europe (Pays-Bas,

Irlande, Danemark, Espagne). D’une manière globale, la balance commerciale de la conchyliculture française est donc déficitaire. On recensait en 2001 presque 3 750 entreprises conchyloles (Agreste, 2005) en France, employant près de 20 000 personnes. Il est à noter qu’actuellement, le nombre d’entreprises diminue fortement (e.g. départs en retraite, difficultés d’installation pour les jeunes conchyliculteurs) alors que la taille des entreprises s’accroît. Les tonnages produits ont plutôt tendance à augmenter, ce qui montre que la productivité tend globalement à s’améliorer. En 2006, le chiffre d’affaire national était de 630 millions d’euros (CNC, 2006). En 2013, d’après le Ministère de la Transition Ecologique, la valeur des ventes de la production française conchylole s’élevait à 535 millions d’euros. Les crises de mortalités et les difficultés professionnelles rencontrées semblent tout de même impacter l’économie de ce secteur.

3.1.2 L’économie conchylole dans les Pertuis Charentais

D’après les données de l’Agreste (Gilbert & Duret, 2014), au recensement de la conchyliculture 2012, la Nouvelle-Aquitaine est la première région française pour la production de coquillages (Figure 8). Cette production est composée de 30 000 tonnes d’huîtres creuses « claires » de Marennes-Oléron, de 13 440 tonnes d’huîtres creuses sans appellation, de 40 tonnes d’huîtres plates, de 13 500 tonnes de moules, de 370 tonnes de palourdes ainsi que de 490 tonnes de coques et autres coquillages (amandes, clams, coquilles, couteaux, etc.).

En région Nouvelle-Aquitaine, la production des huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, est concentrée essentiellement sur deux zones : Marennes-Oléron avec 72 % des entreprises régionales (85 % des ventes régionales d’huîtres creuses) et le bassin d’Arcachon (300 entreprises). L’élevage des moules se situe plutôt sur la baie de l’Aiguillon, au nord de la Rochelle (Charente-Maritime), au niveau du Pertuis Breton.

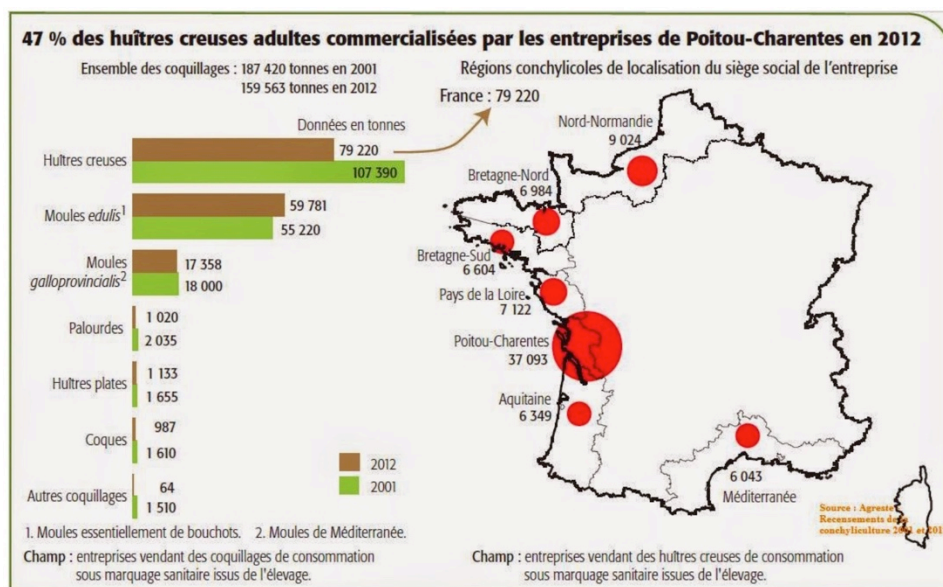


Figure 8. Recensement de la conchyliculture en France (Agreste, 2014).

La Charente-Maritime est le premier département français producteur de coquillages, avec le tiers de la production nationale d’huîtres (Marot, 2018). En 2012, le secteur des Pertuis Charentais regroupe 742 entreprises ostréicoles. Quatre-vingts pour cent des huîtres nées en Charente-Maritime partent grossir ailleurs, dont une partie revient pour l’affinage en claires pour bénéficier de l’appellation

« Marennes-Oléron (Label Rouge) ». En 2012, 37 000 tonnes d’huîtres creuses ont été commercialisées pour la consommation, ce qui représente 47 % du volume national.

A travers les chiffres actualisés par le Comité Régional de la Conchyliculture Charente-Maritime, en 2019, le secteur de l’ancienne région Poitou-Charentes est représenté comme :

- ⇒ 1^{er} centre conchylicole européen ;
- ⇒ 1^{ère} région pour son nombre d’entreprises conchylicoles ;
- ⇒ 1^{er} centre de captage naturel de naissain français (huîtres & moules) ;
- ⇒ 1^{er} lieu pour l’affinage en claires ;
- ⇒ 1^{er} centre français de production et d’expédition d’huîtres.

Sur le secteur des Pertuis Charentais, en 2019, l’activité ostréicole produit un tonnage commercialisé de 45 000 t d’huîtres (40 % du volume national). Le chiffre d’affaire ostréicole sur cette même année serait d’environ 220 millions d’euros. La crise sanitaire engendrée par l’apparition de la COVID-19 en fin d’année 2019 et perdurant encore aujourd’hui, a entraîné des baisses économiques dans le secteur ostréicole. Les données chiffrées ne sont pas encore disponibles et certains événements majeurs (e.g. fêtes de Noël et Nouvel An) pourraient sauver une année 2020 difficile dans le secteur aquacole.

3.2 Les activités agricoles dans les Pertuis Charentais

La surface agricole utile (SAU) représente les deux tiers de la surface totale du département et se compose principalement de terres arables consacrées pour plus de la moitié à la culture céréalière (blé et maïs ; Figure 9). Les prairies occupent 10 % de la SAU, valorisées grâce à l’élevage bovin et les produits qui en découlent (lait, beurre). Le vignoble concentre la majorité de la surface dévolue aux cultures permanentes, la moitié du vignoble de Cognac étant localisée en Charente-Maritime. Les zones humides intérieures ou maritimes couvrent 6 % du département. Le département est peu boisé, les surfaces concernées ne représentent que 18 % de la surface du département soit moitié moins que dans le reste de la région (Lafargue, 2019).

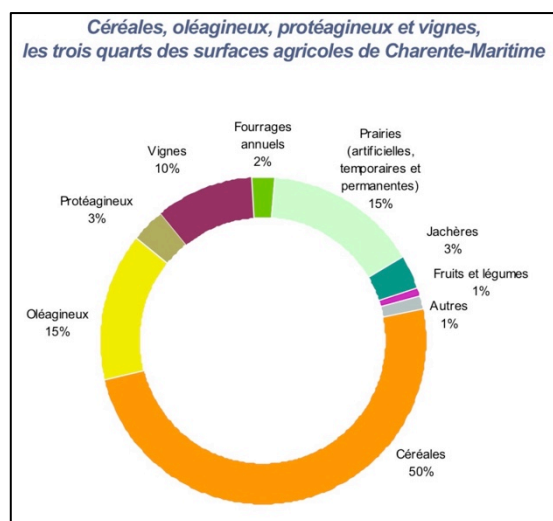


Figure 9. Utilisations des surfaces agricoles de Charente-Maritime. D’après les données de Lafargue (2019).

En 2017, la production de la valeur de la branche agricole s’élevait à 1,2 milliard d’euros. Ceci positionne la Charente-Maritime au 2^{ème} rang des départements néo-aquitains et au 17^{ème} rang national, pesant pour 2 % de la ferme en France. Près de 7 500 exploitations agricoles sont dénombrées en Charente-Maritime.

B. Le modèle biologique : l’huître creuse (*Crassostrea gigas*)

1. Présentation de l’huître creuse

Le choix du modèle d’étude s’est porté sur l’huître creuse (*C. gigas* ; Bayne *et al.*, 2017, 2019) car c’est l’espèce d’huître la plus répandue sur nos côtes et la plus exploitée en ostréiculture (Gilbert *et al.*, 2014). Le nom de l’espèce est encore constamment discuté par la communauté scientifique. Effectivement, les noms *Crassostrea* ou *Magallana* sont utilisés à ce jour. Dans la suite de ce manuscrit et publications scientifiques, le nom *Crassostrea gigas* sera utilisé.

L’huître creuse (*Crassostrea gigas* ; Thunberg, 1793) possède une classification systématique décrite ci-dessous :

Les différents genres d’huîtres sont classés dans la classe des *Bivalvia*, l’ordre des *Pteroida* et la super-famille des *Ostracea* (Boudry *et al.*, 1994). Puis, la famille a été divisée en 12 genres (Stenzel, 1947). De 1951 à 1971, les auteurs s’accordent à diviser la famille en 3 genres : *Ostrea*, *Crassostrea* et *Pycnodonte*.

L’huître indigène originelle est l’huître plate (*Ostrea edulis*). Les premières cultures remontent au XVII^{ème} siècle dans le bassin de Marennes-Oléron (Buestel *et al.*, 2009). Mais sa production est devenue très marginale aujourd’hui. L’huître portugaise (*Crassostrea angulata*) l’a supplantée en 1868. Après une épizootie dans les années 1970, causé par la « maladie des branchies » et mettant fin à la présence de l’huître portugaise sur les côtes françaises, c’est l’huître japonaise qui fut importée et qui représente aujourd’hui la majeure partie de la production française d’huîtres creuses (*Crassostrea gigas*). Les événements historiques marquants de l’ostréiculture sont représentés dans la Figure 10.

Cependant, malgré un bloom économique durant les années 1990 et 2000, l’espèce *C. gigas* est touchée depuis quelques années par l’Herpès virus OsHV-1 (Ostreid Herpes Virus 1). Ce virus s’attaque aux naissains d’huîtres, âgés de moins de 1 an et potentiellement plus faibles lors des saisons estivales que les adultes. Durant les années, 2008, 2011 et 2014, des taux de mortalités de l’ordre de 60-80 % ont été observés dans les productions de naissains au niveau local. De plus, les concentrations croissantes en contaminants émergents pourraient accentuer la faiblesse du système immunitaire des huîtres durant cette période.

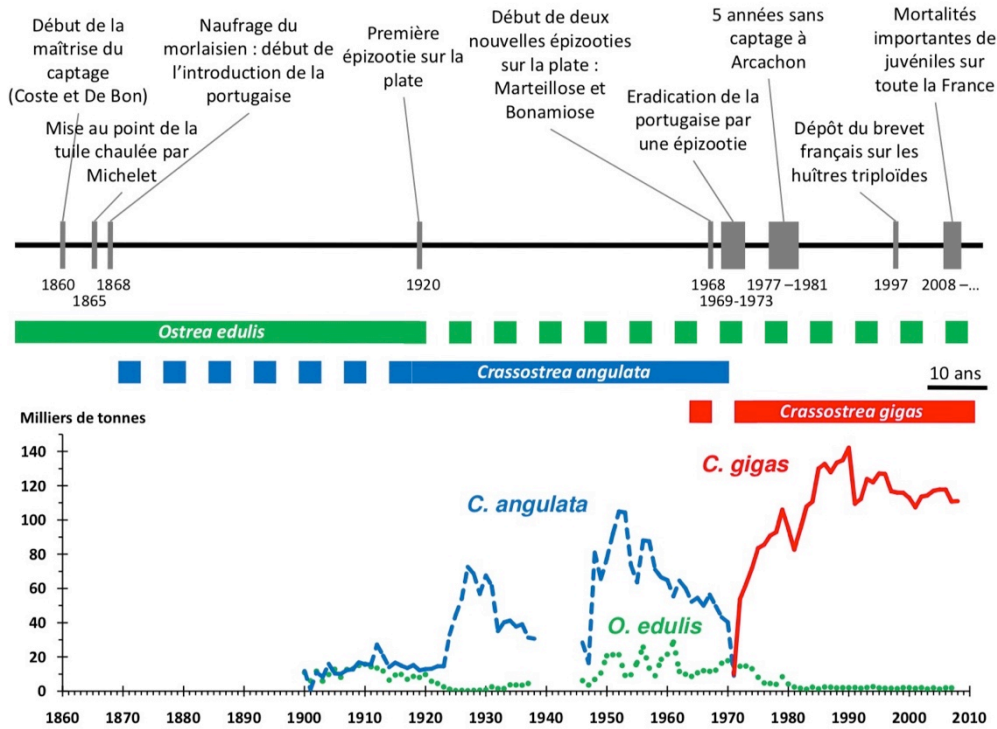


Figure 10. Différents événements marquants dans l’ostréiculture française et évolution des tonnages de productions pour les trois espèces élevées. D’après Buestel *et al.* (2009) ; Gouletquer & Héral (1997) et Bernard (2011).

2. Les méthodes de production

Différentes méthodes de production existent chez les ostréiculteurs, et utilisant deux types d’huîtres différentes en termes de génétique : les diploïdes (2N) et triploïdes (3N). Les huîtres triploïdes sont obtenues par croisement entre des huîtres femelles diploïdes et des mâles tétraploïdes (4N = 40 chromosomes). Elles sont proposées aux professionnels de la filière depuis l’année 2000. Elle est stérile, et son effort de reproduction et donc ses ressources énergétiques restent mobilisées pour la croissance et l’engraissement des chairs. Cela reste un avantage certain pour pouvoir consommer des huîtres durant toutes les périodes de l’année et notamment l’été, lors de la période de laitance (période de gamétogénèse) pour les huîtres diploïdes. Pour cette raison, les huîtres triploïdes sont souvent appelées « huîtres des quatre saisons ».

De plus, deux méthodes existent pour obtenir du naissain de grossissement : les huîtres « naturelles » sont captées sur des zones de captage naturelles, très présentes dans la région de Marennes-Oléron, en Bretagne et sur le Bassin d’Arcachon. Mais depuis quelques années, les écloseries proposent des naissains, nés en laboratoire dans des espaces fermés et contrôlés. Les professionnels peuvent alors acheter des naissains afin de les amener en grossissement sur les parcs de production en mer. Plusieurs techniques existent : suspendues, en poches surélevées, sur le sédiment (Figure 11). Dans la région des Pertuis Charentais, la méthode la plus couramment rencontrée est le grossissement en poches surélevées sur tables de production métalliques.

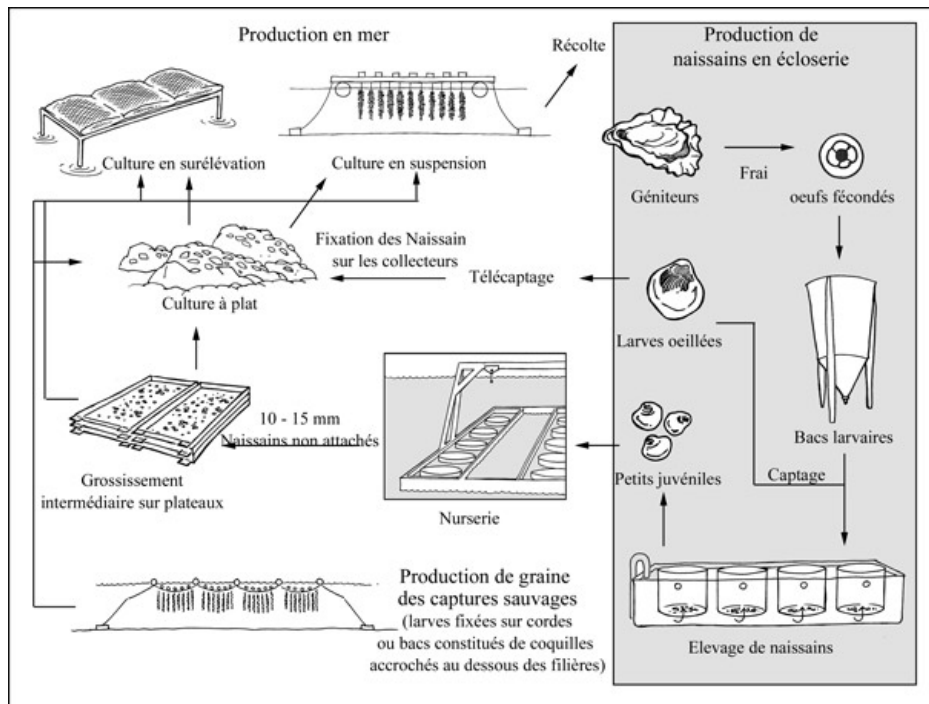


Figure 11. Méthodes de production de l’huître creuse en éclosérie puis en milieu marin. D’après Miossec *et al.* (2009) et Helm *et al.* (2006).

Le cycle de production des huîtres commercialisables se fait donc sur une période généralement de 3 à 4 ans, suivant plusieurs étapes essentielles :

(1) Le captage : Les ostréiculteurs installent des collecteurs en mer, sur lesquels les larves d’huîtres vont venir se fixer et commencer leur développement. Les collecteurs vont rester en mer durant 4 à 8 mois. Ils sont ensuite récupérés et transportés à la cabane d’exploitation, afin de récupérer les naissains (détroquage) à leur plus jeune âge. Les naissains sont triés et placés en poches de mailles fines.

(2) Le demi-élevage : cette étape porte sur le grossissement des petits naissains en poches de mailles fines durant une période de 1 à 2 ans. Les poches sont régulièrement retournées et tapées afin d’éviter que les huîtres ne collent entre elles et sur la poche.

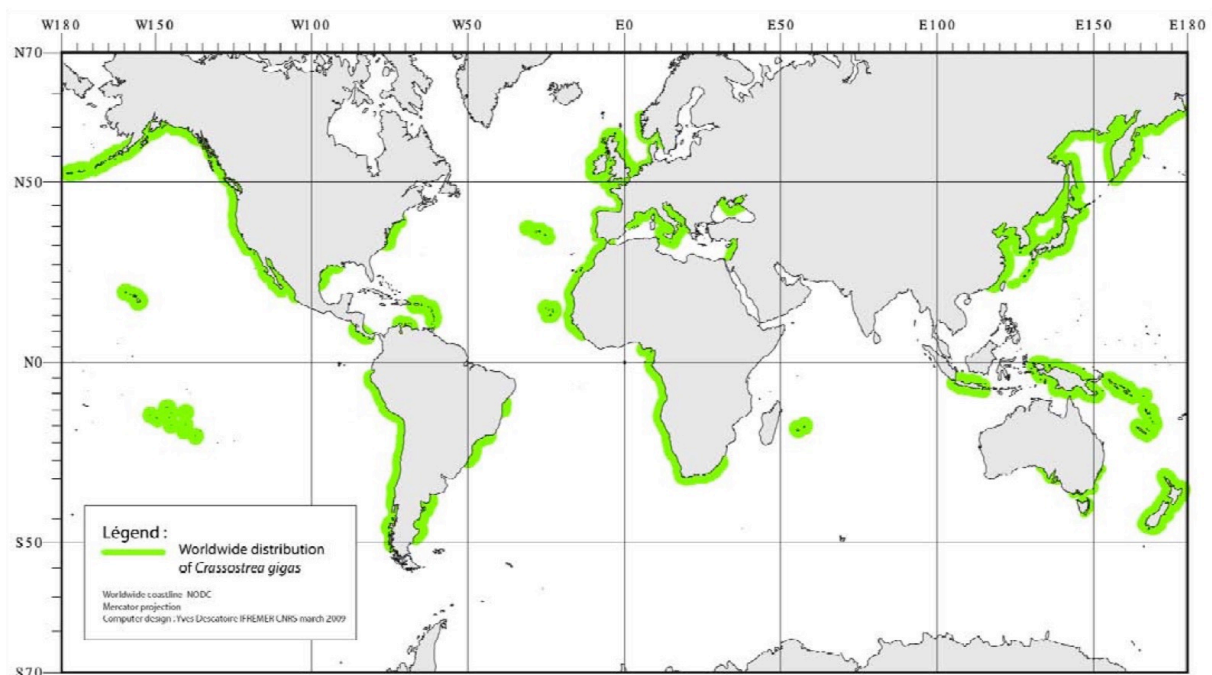
(3) L’élevage : les huîtres creuses plus âgées sont placées dans des parcs situés dans des zones riches en phytoplancton afin d’optimiser la croissance et l’engraissement. Cette étape dure encore de 1 à 2 ans.

(4) La finition : les huîtres creuses adultes sont repositionnées dans les zones d’exploitation à terre. Elles sont placées durant un certain temps, en claires (zones de marais) afin d’être affinées. Il existe plusieurs catégories d’huîtres creuses en fonction de leur affinage : fine de claire, fine de claire verte (présence de navicule bleue, *Haslea ostrearia* et du pigment bleu, la marenne), spéciale de claire et pousse en claire. Certaines huîtres sont labélisées « Label Rouge – Marennes-Oléron » avec un cahier des charges spécifique à suivre pour la production afin de bénéficier de ce label pour la vente aux consommateurs. Le temps d’affinage et les densités d’huîtres dans les bassins de claires sont des paramètres déterminants. Par la suite, les huîtres seront placées dans des dégorgeoirs (bassins

bétonnés) afin que les bivalves puissent se débarrasser de leurs impuretés (vase, sable, etc.) avant l’étape finale de vente et exportation à l’échelle nationale et internationale.

3. L’habitat et l’aire de répartition

Historiquement, le foyer évolutif, de l’huître creuse (*C. gigas*), est centré sur l’Asie et plus précisément sur le Japon d’où son nom : l’huître creuse japonaise. Les qualités reconnues de *C. gigas* (croissance rapide, résistance aux fortes turbidités et aux variations de températures) ont conduit à son introduction dans de nombreuses régions du monde (Huvet, 1999). Comme précisé, ci-dessus, l’huître *C. gigas*, a été introduite dans les années 1970. Les premiers cas de recrutement ont été observés à Marennes-Oléron et Arcachon en 1975 (Grizel & Heral, 1991). Dans les années 1980, quelques recrutements se produisirent au nord de la Loire mais la colonisation restait très sporadique. A partir du milieu des années 1990 les épisodes de reproduction se sont multipliés dans les sites plus au nord en Bretagne et la colonisation s’étend désormais sur la façade Manche-Atlantique, du Golfe Normano-Breton à la frontière espagnole (Hily, 2009). En dehors du littoral Français, l’huître creuse, s’est également répandue, au début des années 1990, en mer du Nord, en mer de Wadden, en Hollande et dans le Westerschelde (Reise *et al.*, 1998 ; Drinckwaard, 1999 ; Wehrmann *et al.*, 2000). *Crassostrea gigas*, est également présente en Belgique, en Grande Bretagne (Eno *et al.*, 1997) et en Irlande. Il est même arrivé que l’espèce soit introduite involontairement comme au Danemark (Wang *et al.*, 2007), Norvège (Mortensen *et al.*, 2007), Suède (Wrange *et al.*, 2010), et Nouvelle-Zélande (Dinamani, 1991). Ces différents éléments sont récapitulés dans la carte présente en Figure 12.



L’introduction de l’huître creuse a engendré des effets néfastes sur les écosystèmes côtiers. De profondes modifications des écosystèmes ont été observées : récifalisation des vasières, remplacement des gisements de moules, atteinte grave aux récifs d’Hermelles, compétition trophique avec les

élevages déjà présents et les coquillages sauvages (Gouletquer & Le Mao, 2018). L’espèce présente des caractéristiques proches de celles des espèces invasives proliférantes pouvant perturber des écosystèmes et la biodiversité associée (Hily, 2009).

4. L’anatomie et la nutrition

L’huître creuse (*Crassostrea gigas*), bivalve filtreur, est une espèce ovipare qui a une grande importance dans les écosystèmes marins au niveau écologique (couplage et maintien de la vie benthique-pélagique, dynamique des nutriments, stabilisation des sédiments, fourniture d’habitats, puits à carbone, etc. (Fodrie *et al.*, 2017 ; Coen & Luckenbach, 2000).

La notion de fonction écologique est aujourd’hui définie comme l’ensemble des processus biologiques de fonctionnement et de maintien des écosystèmes (de Groot *et al.*, 2010 ; Maurel, 2010).

D’un point de vue anatomique, elle possède un muscle adducteur qui lui permet de s’ouvrir et de se fermer afin de se protéger des prédateurs ou des périodes d’exondations (balancement de marées). Par ailleurs, elle dispose de cils lui permettant de capter les différents éléments nutritifs présents dans son environnement. L’huître va pomper l’eau de mer afin de filtrer les particules utiles à son développement comme le phytoplancton, le calcium ainsi que l’oxygène. En plus d’extraire de l’oxygène pour la respiration, les branchies agissent comme un filtre qui retient les particules (Gerdes, 1983 ; Bougrier *et al.*, 1995, 1998 ; Gouletquer *et al.*, 1999, 2004). On retrouve aussi le manteau, tégument, permettant de protéger et recouvrir la chair de l’huître. Quelques éléments anatomiques sont présentés en Figure 13.

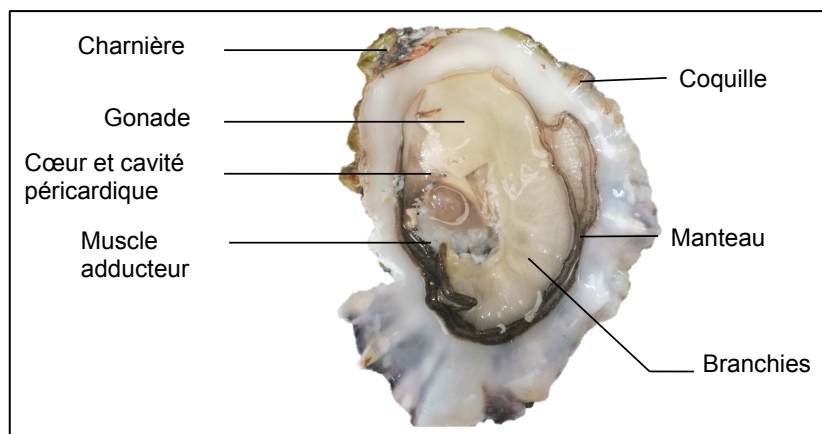


Figure 13. Quelques éléments d’anatomie chez l’huître creuse (*C. gigas*). Schéma réalisé d’après les travaux de stage de Bénédicte Lalot (2020). © Bénédicte Lalot et Arno Bringer.

L’huître creuse (*C. gigas*), commence à se nourrir de manière exogène au stade larvaire à partir de l’âge de 3 jours environ (His *et al.*, 1999a, b). Avant ce stade, les larves-D se nourrissent exclusivement grâce aux réserves vitellines présentes. Puis vers le cinquième jour, les larves-D deviendront exclusivement planctotrophe (Rico-Villa *et al.*, 2010). Par la suite, le phytoplancton est filtré par les huîtres afin de satisfaire sa nutrition (phase exotrophe ; Ben Kheder, 2007). Il a été démontré que les huîtres avaient la capacité de trier les particules de phytoplancton en fonction de leurs tailles au niveau des palpes branchiaux et labiaux (Barillé *et al.*, 1997 ; Bougrier *et al.*, 1997). Le

phytoplancton est ensuite dirigé vers la bouche par l’action des cils et les résidus non-désirés sont excrétés par les fèces et pseudo-fèces (regroupés sous le terme de biodépôts) au niveau de l’anus.

Le développement du système nerveux, chez l’huître creuse, se fait au cours du développement larvaire. Les larves-D se sont avérées avoir une neurogenèse limitée avec seulement un rudiment de ganglion antérieur. Le système nerveux des larves pédivéligères est similaire à celui des larves-D, selon une étude menée par Ellis & Kempf (2011). Au stade plus tardif adulte, les huîtres possèdent trois paires de ganglions (deux ganglions cérébraux et un viscéral), masses de cellules nerveuses (neurones) reliées par des connectifs analogues aux axones (Yurchenko *et al.*, 2018). De plus, le réseau de régulation neuroendocrine-immunitaire joue un rôle indispensable dans l’immunité de l’hôte. Ce réseau est régulé et contrôlé, par le système nerveux et les hémocytes, chez l’huître, *Crassostrea gigas* (Liu *et al.*, 2017).

5. La reproduction et le cycle de vie

5.1 La gamétogénèse, ponte et fécondation

Au cours de la première phase de gamétogénèse, les géniteurs adultes sessiles mûrent et produisent un grand nombre de gamètes. Cette maturation commence à la fin de l’hiver ce qui, sur les côtes françaises, correspond généralement à des températures de l’eau de 8 à 11 °C (Le Dantec, 1968 ; Pouvreau & Lepennec, 2006). Elle se poursuit ensuite jusque vers le mois de juillet.

En outre, l’huître creuse est une espèce hermaphrodite successive (Barnabé, 1991) qui change généralement de sexe à chaque saison (Amemiya, 1929). La première année, jusqu’à 70 % des individus sont des mâles. Néanmoins il a été observé qu’en vieillissant les individus avaient plus de chance d’être des femelles (90 %). Selon Lango-Reynoso (1999) la détermination du sexe des individus dépend des paramètres environnementaux. À la suite de la phase de maturation, l’augmentation de la température de l’eau de mer va déclencher un stress naturel induisant la ponte (Bouchet *et al.*, 1997). Aucune ponte n’est possible en dessous de 20 °C (Auby *et al.*, 2014). La reproduction en milieu naturel sur nos côtes a donc lieu généralement entre juillet et août. A cette période, l’huître creuse entre dans une période d’instabilité où des conditions favorables pourront déclencher l’émission des gamètes. L’émission des gamètes chez l’huître creuse se traduit chez la femelle par de violents mouvements valvaires. Ceci rend la ponte de la femelle détectable au moyen d’un enregistrement de l’activité valvométrique notamment (Nelson, 1928 ; Galtsoff, 1938 ; His, 1975). Chez le mâle, c’est une importante action des cils qui propulse les spermatozoïdes à l’extérieur. Cette émission de gamètes peut être partielle ou totale en fonction de la quantité de gamètes et des conditions du milieu. La durée de ponte peut aller de quelques minutes à plus d’une heure. Elle a lieu préférentiellement durant le flot de la marée (Nelson, 1928 ; Carriker, 1951). Il existe généralement plusieurs émissions durant l’été. Durant cette thèse, nous avons pu observer des huîtres adultes mûres avec les gonades remplies, durant les mois d’octobre et novembre 2020. Les fortes périodes de chaleurs et les variations saisonnières impactent le cycle des huîtres. Les variations climatiques et le réchauffement des eaux de surface bouleversent aussi les cycles de maturation et de ponte, chez l’huître creuse.

La fécondation est externe : la rencontre entre l’ovule et le spermatozoïde a lieu au sein de la colonne d’eau, dans le milieu marin, directement après la phase de ponte. Effectivement, une fois, les gamètes libérées, dans le milieu extérieur, la fécondation va pouvoir se réaliser. Les gamètes mâles et femelles vont se rencontrer quelques minutes après leur émission par les géniteurs matures. La fécondation est

facilement observable au microscope, notamment au niveau des ovocytes femelles. 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 6 h après la fécondation sont obtenus les premiers stades larvaires (larves trocophores) et 24 h après (larves-D).

5.2 Les stades larvaires

Après 24 h, la larve d’huitre creuse est appelée larve-D en raison de sa forme. Elle mesure environ 50-60 μm et dispose d’une petite coquille comportant deux valves, une charnière et un velum. La phase larvaire pélagique peut durer entre 15 et 25 jours selon les conditions environnementales. Après le stade pélagique larvaire, la larve commence à former sa coquille mais également sa charnière qui lui servira à ouvrir et fermer ses valves une fois adulte : c’est le stade véligère. La larve grandira jusqu’à atteindre environ 300 μm . La formation du pied aboutira au stade pédivéligère qui permettra aux larves de ramper jusqu’à leurs zones de fixation (Figure 14). Enfin, celles-ci se fixeront sur un substrat dur : on parlera de métamorphose. La fixation hors milieu naturel s’effectue avec de la microbrisure (coquilles d’huitres broyées), par la technique de télécaptage. La fixation est un processus définitif qui engendre des transformations chez l’huitre (Marteil, 1976). Premièrement le velum va disparaître, le pied va ensuite sécréter une substance permettant la fixation définitive.

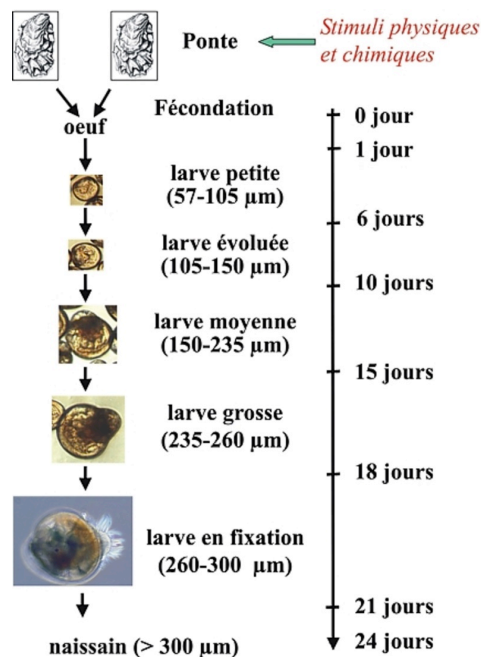


Figure 14. Cycle de développement larvaire chez l’huitre (*C. gigas*). D’après Auby & Maurer (2004).

En outre, une nouvelle coquille va se former et les branchies vont apparaître (Auby & Maurer, 2014). La métamorphose transformera les huitres en espèces sessiles. Elles mettront un peu plus de deux ans avant de devenir matures à leur tour.

6. L’intérêt écotoxicologique de l’huître creuse

Les organismes bivalves et filtreurs ont toujours présenté un grand intérêt en écotoxicologie (Zhou *et al.*, 2008). L’huître creuse (*Crassostrea gigas*), tout particulièrement, est une espèce intéressante à étudier car elle est facilement disponible et en grande quantité dans le milieu naturel (Quiniou *et al.*, 1991). De plus, avec l’émergence des écloseries de bivalves, on peut se procurer des huîtres de tous les âges, en toutes saisons de l’année. Par ailleurs, l’huître creuse est une espèce bioindicatrice (Phuong *et al.*, 2018b) et sa présence dans un milieu, (ou son absence) peut donner des informations sur l’état écologique du milieu, ou sur l’incidence de certaines pratiques humaines. Cette espèce tolère de grandes variations environnementales, comme la température, la salinité et les variations de pH. Néanmoins, au stade larvaire, les invertébrés, sont considérés comme plus sensibles aux variations de l’environnement et notamment aux polluants (Connor, 1972 ; Quiniou, 2005). Les premiers stades de développement (appelés stades précoces) sont utilisés pour de nombreuses expérimentations et dans notre cas pour des tests de toxicité afin de comprendre et visualiser les potentiels stress environnementaux que pourraient subir ces stades précoces à la suite de phénomènes de pollutions. Afin d’obtenir des informations et résultats sur les effets des polluants présents dans le milieu, des tests écotoxicologiques à court terme sur les stades embryo-larvaire ont été mis au point (His *et al.*, 1999a). Ces tests d’embryotoxicité sont normalisés par l’AFNOR (NF ISO 17244, 2015). Deux types de tests sont à distinguer selon le temps d’exposition plus ou moins important des organismes indicateurs : les tests de toxicité aigüe 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 quelques semaines à toute la durée de vie de l’organisme. Les huîtres restent faciles à manipuler en laboratoire. Plusieurs précédentes études se sont intéressées aux tests embryo-larvaires afin d’observer les effets potentiels des métaux (Beiras & His, 1994 ; Mai *et al.*, 2012), pesticides (Akcha *et al.*, 2012 ; Behrens *et al.*, 2016 ; Mai *et al.*, 2013), MP (Cole *et al.*, 2015 ; Sussarellu *et al.*, 2016) et NP (Tallec *et al.*, 2018). La résistance de cet organisme au stress est également un paramètre intéressant permettant d’étudier les effets de contaminants à des niveaux de concentrations sublétales élevés. Le Tableau 1 présente quelques études précédentes sur le modèle *C. gigas* au stade embryo-larvaire associées à des expositions à des contaminants.

Tableau 1. Quelques exemples d’études expérimentales écotoxicologique sur le stade embryo-larvaire chez *Crassostrea gigas*, en exposition à différents contaminants.

Contaminants	Effets analysés	Références
Cuivre Glyphosate	Malformations larvaires	His <i>et al.</i> , 1999b
Benzo(a)pyrène	Malformations larvaires Test des comètes	Wessel <i>et al.</i> , 2007
Cu, Cd, S-Métolachlore, Irgarol	Malformations larvaires Dommage à l’ADN	Mai <i>et al.</i> , 2012
Diuron	Génotoxicité sur les spermatozoïdes Anomalies de développement embryonnaire et larvaire	Akcha <i>et al.</i> , 2012
Glyphosate AMPA Roundup	Malformations larvaires	Mottier <i>et al.</i> , 2013
Phénanthrène	Malformations larvaires	Nogueira <i>et al.</i> , 2017

NP de PS	Interactions avec les gamètes	Gonzalez Fernandez <i>et al.</i> , 2018
Cuivre S-Métolachlore	Comportement de nage Malformations larvaires	Gamain <i>et al.</i> , 2020
MP de PS NP de PS	Malformations larvaires Taux de fécondation Modifications cellulaires	Taltec <i>et al.</i> , 2018 Taltec, 2019

C. Les contaminants testés en conditions expérimentales

1. Les microplastiques

1.1 La production et l’industrialisation des plastiques

Les plastiques sont des polymères organiques synthétiques issus de la polymérisation de monomères extraits d’huiles ou de gaz. La production en masse de plastique a débuté dans les années 1940 (Cole *et al.*, 2016). Le développement des techniques de production a permis la production à faible coût d’un matériau léger, inerte, résistant à la corrosion et durable (temps de vie) ; entraînant des usages massifs dans de nombreux domaines tels que les emballages, l’aéronautique et l’automobile, la construction, etc. (Cole *et al.*, 2011). La production de plastique a connu une croissance exponentielle dans le monde depuis les années 1970 (Figure 15).

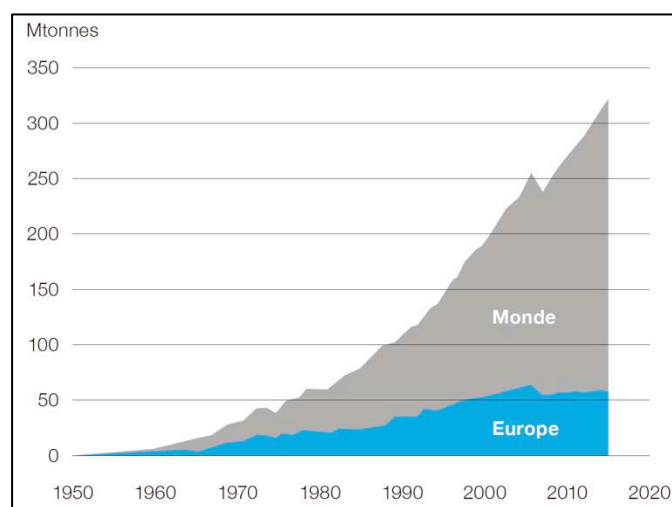


Figure 15. Explosion de la production et consommation du plastique dans le monde et en Europe depuis 1970. D’après Bouwmeester *et al.* (2015) et PlasticsEurope (2013).

En 2017, le polypropylène (PP), le polyéthylène (PE) (haute densité (HDPE) + faible densité (LDPE)) et le polychlorure de vinyle (PVC) représentaient respectivement 17 %, 29 % et 9 % de la production mondiale de plastique (Geyer, 2020) soit à eux trois 55 % de la production totale. Leurs hautes résistances à l’usure et à la dégradation, mais aussi leurs souplesses d’usage, sont les caractéristiques qui en font des matériaux extrêmement populaires pour les industries, mais qui en font aussi un matériau très persistant dans l’environnement (Rios *et al.*, 2007). La très forte consommation

mondiale de plastique et la mauvaise gestion des déchets qui y est associée sont responsables du déversement à grande échelle de ces plastiques dans les océans et les milieux côtiers (Strungaru *et al.*, 2019). Elle était de 348 millions de tonnes en 2017, dont 64 millions de tonnes en Europe (PlasticsEurope, 2018). Parmi les plastiques produits, en Europe, en 2017, on retrouvait 19,3 % de PP utilisé entre autre dans les emballages et l’industrie automobile ; 17,5 % de LDPE, un composant des sacs réutilisables et des films alimentaires ; 13,3 % d’HDPE, que l’on retrouve dans les bouteilles et les emballages alimentaires ; 10,2 % de PVC, un composant des canalisations et tuyaux divers ; 7,7 % de polyuréthane, présent dans les matelas et les isolants ; 7,4 % de polytéréphtalate (PET) d’éthylène, présents dans les emballages alimentaires (PlasticsEurope, 2018). Aujourd’hui, on estime à 400 millions de tonnes la production mondiale de plastique par an (Atlas du Plastique, 2020). Une grande partie des déchets produits en Europe et en Amérique du Nord est exportée en Asie et Afrique pour leur retraitement (Brooks *et al.*, 2018). Par exemple, la Chine a réceptionné 45 % de l’intégralité des déchets produits depuis 1992 (Brooks *et al.*, 2018). Avec la crise sanitaire de la COVID-19, un déclin de la production de plastique a pu être observé, lié à la baisse de production et d’industrialisation de certaines grosses entreprises à l’arrêt (PlasticsEurope, 2020).

On estime qu’entre 4,8 et 12,7 millions de tonnes de plastiques se déversent dans l’océan chaque année (Jambeck *et al.*, 2015). Environ 80 % de cette production est constituée des cinq principaux polymères : PP, PVC, polystyrène (PS), PET ainsi que HDPE et LDPE (Jambeck *et al.*, 2015). Afin de bien comprendre la menace plastique à plus long terme, des outils de modélisation ont été mis en place afin d’obtenir des simulations pour les années futures. Si aucun effort n’est fait dans la gestion des déchets, la production de déchets mal gérés en Asie pourrait doubler de 52 millions de tonnes par an en 2020, à 129 millions de tonnes par an en 2060 (Figure 16). L’Afrique deviendrait aussi le continent avec une augmentation exponentielle de déchets mal gérés. En utilisant ces projections, il a été démontré que la majorité des plastiques mal gérés (91 %) sont produits sur des bassins versants de plus de 100 km², ce qui suggère que les rivières sont des voies principales pour les déchets plastiques vers l’océan (Lebreton & Andrady, 2019).

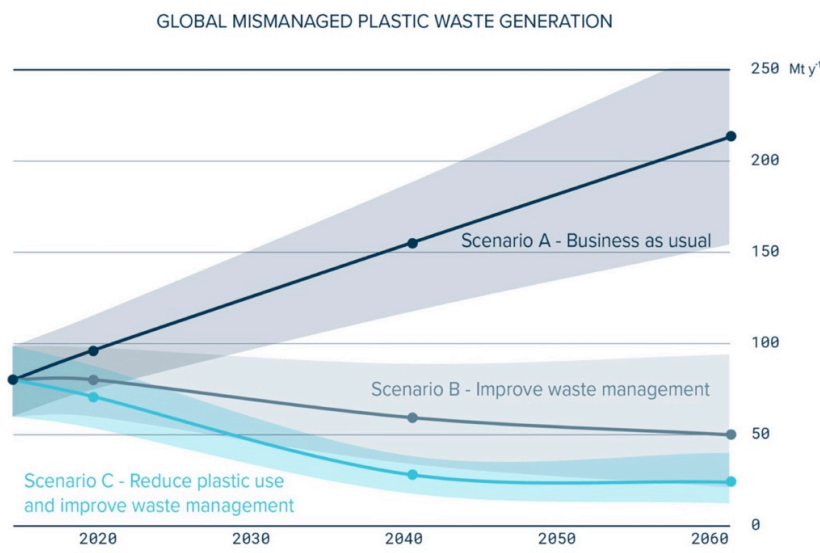


Figure 16. Modélisation en fonction de 3 scénarios de la quantité de plastiques mal gérés et relargués dans l’environnement. (Scénario A) aucune modification des comportements et politiques actuelles ; (Scénario B) Amélioration de la gestion des déchets plastiques ; (Scénario C) Amélioration et diminution des quantités produites. D’après Lebreton & Andrady (2019).

On retrouve différentes catégories de plastiques utilisées dans la consommation quotidienne en France en 2017 (Figure 17). Les plastiques d’emballages alimentaires sont les plus utilisés (e.g. packagings, bouteilles, bouchons, films).

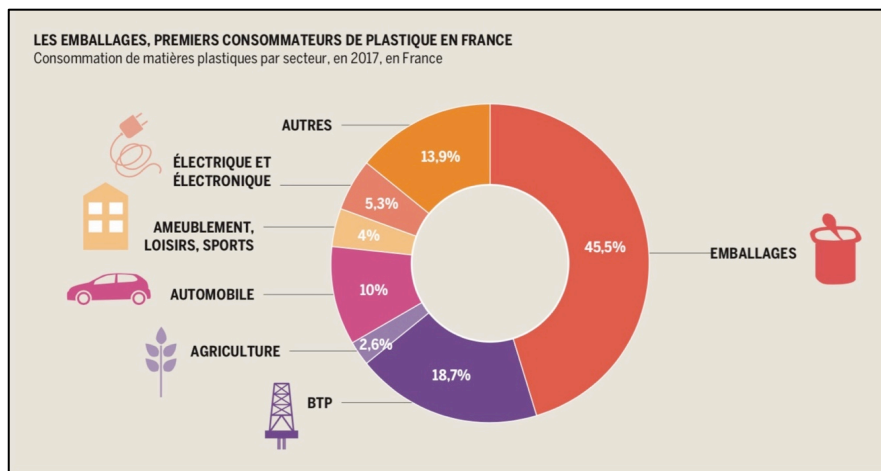


Figure 17. Types de plastiques utilisés dans la consommation Française. D’après les données de l’Atlas du plastique (2020).

1.2 La pollution par les plastiques dans les écosystèmes marins

La résistance du plastique est à la fois sa force lors de son emploi mais aussi sa faiblesse quand il devient un déchet. Si les techniques de recyclage sont en cours de développement et d’amélioration, la plupart des plastiques finissent aujourd’hui en décharge et mettent des siècles à se dégrader. La France affiche, quant à elle, des chiffres médiocres (20-25 %) en termes de recyclage et revalorisation des plastiques, par rapport à ses voisins Européens (Figure 18). En effet, 31 % des plastiques, en moyenne, sont recyclés en Europe. Ce qui classe notre pays avant-dernier sur les 28 pays européens concernant le recyclage des emballages plastiques. Cependant, certains progrès et améliorations devraient se dessiner dans les années à venir.

On estime que 10 % de la production plastique mondiale totale se retrouve dans les écosystèmes marins aujourd’hui (Cole *et al.*, 2011). Parmi les trillions de morceaux de plastiques qui se trouvent dans l’océan, 92 % seraient des MP (Frère *et al.*, 2017), qui pourront continuer, potentiellement, à se dégrader en NP.

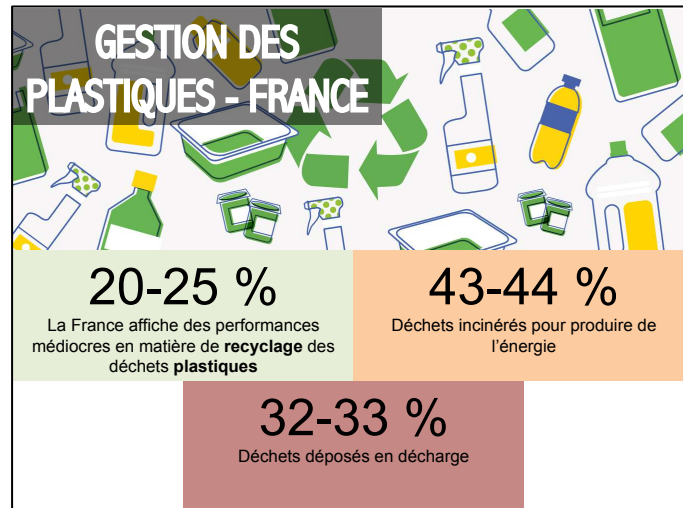


Figure 18. Chiffres clés de la gestion des plastiques en France. Modifié d’après des données de Eurostat (2016).

Les sources de débris de plastiques dans les écosystèmes marins sont multiples. L’association Expedition MED a mené une étude permettant d’estimer que 30,4 % des déchets plastiques côtiers de l’arc atlantique étaient issus des activités maritimes, 11,1 % sont des déchets divers du quotidien, 7,9 % sont d’origine alimentaire et enfin 47,1 % sont des fragments non identifiables (Expéditions MED, 2016). Les plastiques proviennent majoritairement des activités anthropiques sur le continent avec des activités telles que le tourisme, les loisirs, les industries, les zones portuaires, les stations d’épuration, les rejets de déchets illégaux et le lessivage des sols. Certains plastiques sont introduits, quant à eux, dans le milieu marin, par voie directe. Cela correspond aux activités de pêche et d’aquaculture professionnelles ainsi que les activités de pêche de loisir et le nautisme (Andrady, 2011). Les plastiques peuvent être transportés sur de longues distances avant de s’échouer sur les plages ou de sédimenter sur les fonds marins (Lobelle & Cunliffe, 2011 ; Long *et al.*, 2015). Cependant, leurs parcours ne s’arrêtent pas là, une fois sédimentés, ils peuvent être régulièrement remis en suspension dans la colonne d’eau *via* les courants, les marées, le vent, les tempêtes ou *via* des processus biologiques (Lattin *et al.*, 2004). Le plus souvent on associe ce parcours à « la route du plastique », schématisé en Figure 19.

Plusieurs classifications ont été proposées pour caractériser les plastiques selon leurs tailles (Figure 20). En 2013, la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DC SMM) a défini les plastiques ayant une taille supérieure à 25 mm comme macroplastiques, comprise entre 25 mm et 5 mm comme mésoplastiques, comprise entre 5 mm et 1 µm comme microplastiques et inférieure à 1 µm comme nanoplastiques (European Commission *et al.*, 2013). Cette définition des MP a été utilisée dans de nombreuses études (Browne *et al.*, 2008 ; Frère *et al.*, 2017 ; Kazour & Amara, 2020 ; Phuong *et al.*, 2018c). Certaines études qualifient les MP comme étant des particules de plastiques d’une taille de 67 µm à 500 µm (Andrady, 2003 ; Andrady, 2011). Plus largement on considèrera les MP comme étant des particules plastiques de tailles inférieure à 5 mm (Arthur *et al.*, 2009). Bien qu’il n’existe pas de consensus scientifique sur la définition des MP selon leur taille, elles s’orientent souvent selon l’échelle micrométrique, on parlera alors de grands MP, ou simplement MP pour une taille supérieure à 300 µm ou de petit MP ou nano MP pour une taille inférieure à 300 µm (Andrady, 2011).

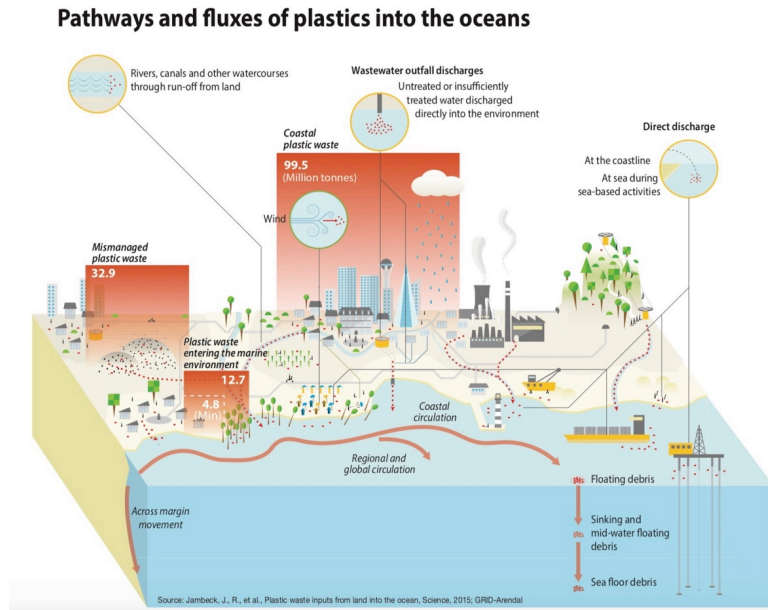


Figure 19. Voies d’entrées et de sorties du plastique dans l’environnement marin. D’après Jambeck *et al.* (2015) et UNEP et GRID-Arendal (2016).

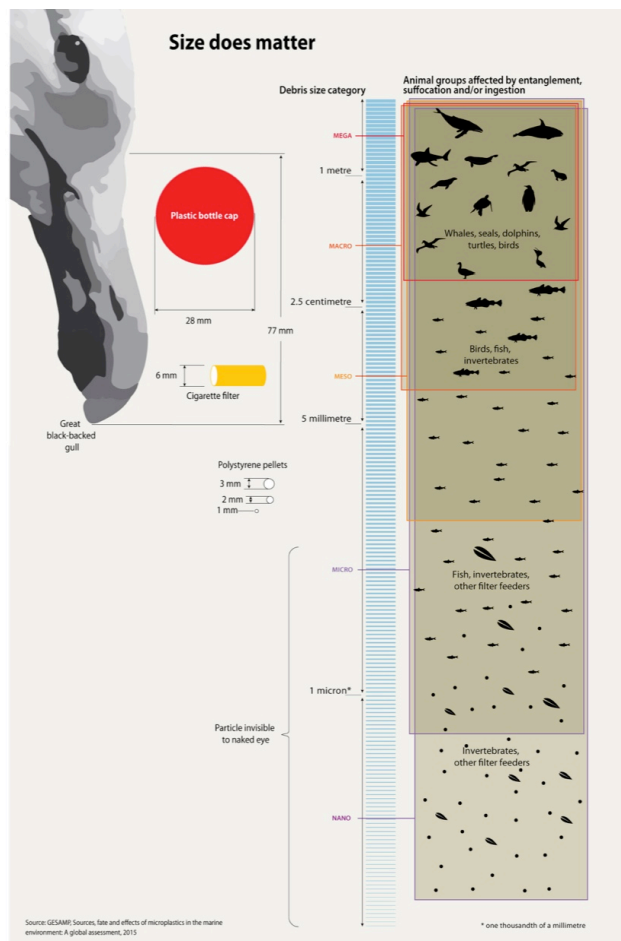


Figure 20. Distribution des tailles de plastiques, micro et nanoplastiques en relation avec les groupes potentiels d’espèces affectés par ces particules. D’après GESAMP (2015) et UNEP et GRID-Arendal (2016).

1.3 Les microplastiques : origine et devenir

Les MP sont mentionnés comme étant d’origine primaire lorsque leur entrée dans l’environnement provient d’une source directe, par exemple lors de leur utilisation dans des cosmétiques, industries pharmaceutiques, des aérosols, granules utilisés dans l’industrie, fibres issues de stations d’épuration, etc. Ils peuvent aussi être dits d’origine secondaire lorsqu’ils proviennent de l’usure d’un plastique plus gros (macrodéchets) *via* un processus mécanique (*e.g.* frottements, érosion, abrasion), chimique ou photochimique (*e.g.* ultraviolets, hydrolyse, oxydation) et/ou biologique (*e.g.* bio-détérioration, bio-fragmentation, assimilation, minéralisation) (Dussud & Ghiglione, 2014 ; Frère, 2017 ; Andrady, 2015). Ils peuvent contaminer l’environnement directement sous forme de particules de plastiques, comme des microbilles, sélectionnées pour leur qualité abrasive, et largement utilisées dans le traitement industriel de surfaces. Il peut également s’agir de granulés industriels de pré-production utilisés pour le développement des produits en plastique (Boucher & Friot, 2020 ; Carbery *et al.*, 2018). Selon leurs propriétés physiques comme la taille, la densité ou l’état de colonisation par un biofilm, les MP se répartissent entre la surface, la colonne d’eau et les sédiments. La réalisation d’un modèle de flottaison a, par exemple, permis d’estimer la répartition des MP en PE et PP dans les écosystèmes marins littoraux. Les particules de plus de 1 mm sont plus susceptibles de flotter à la surface, la moitié des MP de 100 µm se situent entre 24 et 56 m et les particules de 10 µm se trouvent entre 33 et 80 m de profondeur (Enders *et al.*, 2015).

Il est difficile d’évaluer la contamination précise des océans car ceux-ci sont vastes et présentent une variabilité quotidienne et saisonnière. On retrouve des MP dans tous les océans et mers du monde et dans les différentes matrices : eaux, glaciers, sédiments, organismes vivants (Cole *et al.*, 2011). Ces MP sont retrouvés dispersés dans tous les océans du globe (Barnes *et al.*, 2009), y compris en Arctique (Zarfl & Matthies, 2010). La répartition des classes de tailles des MP dans le milieu dépend des processus de distribution et de dégradation (Enders *et al.*, 2015), et leur concentration dans les océans varie spatialement avec notamment des zones d’accumulation au niveau des gires océaniques et des côtes (Law *et al.*, 2010). Les gires, points centraux de vastes courants anticycloniques subtropicaux, sont des endroits où la concentration en débris plastiques est particulièrement élevée (Cole *et al.*, 2011). Un gradient de concentration existe entre les côtes anthropisées, les zones de dépôts ou de courants, et l’océan ouvert (Enders *et al.*, 2015). La Figure 21 documente les différentes zones d’accumulation de déchets plastiques dans les océans. Les océans Atlantique Nord et Indien, représentent respectivement, 51,3 et 53,6 milliers de tonnes de plastiques (*i.e.* macrodéchets flottants dans les gires). D’autres chiffres alarmants sur la pollution plastique ont été publiés récemment :

- ⇒ 80 % des pollutions plastiques seraient d’origine terrestre (Commission Européenne, 2020)
- ⇒ 27 tonnes de déchets marins, collectés chaque année sur le littoral atlantique des Pertuis Charentais (TEO Bac à Marée, 2020).

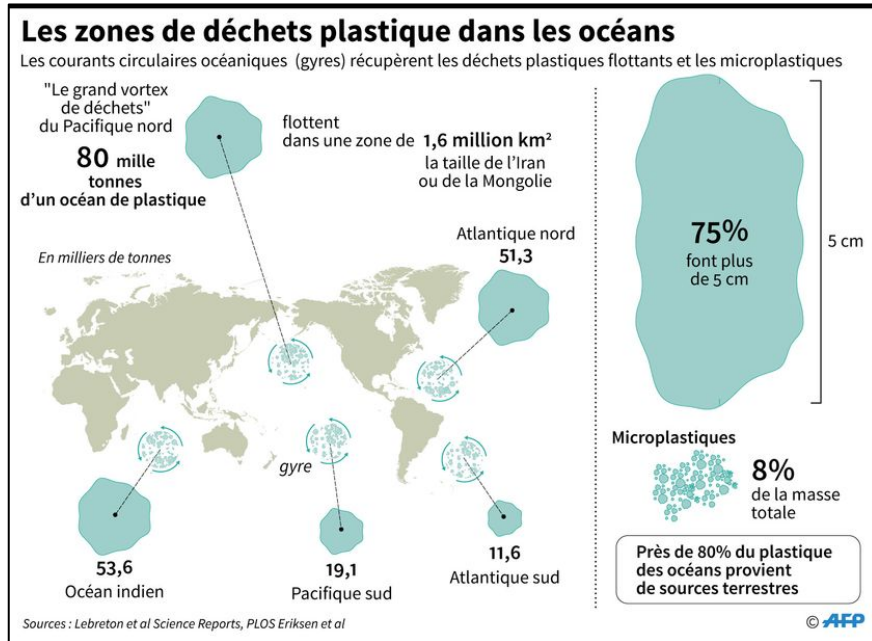


Figure 21. Les zones de déchets plastiques dans les océans. D'après Lebreton *et al.* (2018) et Enders *et al.* (2015).

Des tests expérimentaux en laboratoire, utilisant des concentrations en MP pertinentes pour l'environnement, restent des défis pour l'aide à la décision (Huvet *et al.*, 2016 ; Lenz *et al.*, 2016 ; Rochman, 2016), en particulier si l'on considère le manque de données environnementales sur la quantification de MP aussi petits que ceux utilisés dans la plupart des expérimentations (Paul-Pont *et al.*, 2018). Effectivement, les concentrations environnementales considèrent principalement des classes de taille de MP > 333 μm (Song *et al.*, 2015 ; Zhao *et al.*, 2014 ; Baldwin *et al.*, 2016) et contiennent donc un biais significatif, par rapport aux petites tailles utilisées dans les laboratoires à partir de MP commerciaux. Au sud de la Mer du Nord, des concentrations en MP > 80 μm ont été recensés et un maximum de 1 770 MP/L a pu être quantifié (Dubaiish & Liebezeit, 2013). Dans la même zone géographique, une étude plus récente a montré des concentrations maximales de 245 MP/m³ (Lorenz *et al.*, 2019). Sur les côtes suédoises, des concentrations plus faibles ont été mentionnées avec 2 400 MP/m³ (Norén, 2007). Dans la gamme de taille comprise entre 10 et 1 000 μm , l'étude menée par Enders *et al.* (2015) a montré des concentrations moyennes comprises entre 13 et 501 MP/m³, sur les côtes Européennes. Au niveau de la Mer Méditerranée, des concentrations en MP > 333 μm , ont été quantifiées à hauteur de 0,023 mg/L (Collignon *et al.*, 2012). Des concentrations similaires au niveau de l'ouest méditerranéen et en Adriatique ont été quantifiées (0,026 mg/L, MP > 700 μm ; Suaria *et al.*, 2016). Une grande hétérogénéité de concentration est présente en fonction des différentes études scientifiques (*e.g.* classes de tailles, modes de prélèvements, unités de concentrations). Plus proche de la zone d'étude des Pertuis Charentais, des concentrations en MP > 500 μm ont été quantifiées à hauteur de 210 477 MP/km² (Santos *et al.*, 2019). Plusieurs études se sont concentrées sur l'abondance des MP présents dans les sédiments. Au niveau national, l'étude d'Alomar *et al.* (2016), a permis de quantifier au maximum 897 MP/kg. Au niveau de la Manche, 481 MP/kg ont été recensés dans les sédiments côtiers (Maes *et al.*, 2017). Aujourd'hui, l'utilisation de matériaux plastiques conchylicole n'a pas été défini comme une source de contamination en MP pour les bivalves (Covernton *et al.*, 2019). Cependant, plusieurs études ont rapporté la présence de MP dans les tissus de bivalves. Beaucoup d'études asiatiques ont démontré la présence de MP dans les fruits de mer sur les marchés et dans les environnements aquacoles (Li *et al.*,

2015 ; Fang *et al.*, 2019 ; Cho *et al.*, 2019). Au niveau local, Phuong *et al.* (2018b) ont déterminé des concentrations de $2,1 \pm 1,7$ MP par individus (*C. gigas*) au niveau des côtes atlantiques françaises (région Pays de la Loire). Des huîtres collectés sur les marchés ont montré des concentrations en MP de $0,47 \pm 0,16$ MP/g de chair humide chez *C. gigas* (Van Cauwenbergh & Janssen, 2014). Les MP de toutes tailles sont omniprésents dans les différents compartiments marins (*e.g.* eau de surface, sédiments et biote) des côtes européennes (Tableau 2). La diversité des formes, des tailles, leurs légèretés et leurs faibles densités contribuent au transport généralisé des MP et à leur dispersion dans les systèmes aquatiques (Ballent *et al.*, 2012 ; Lagarde *et al.*, 2016 ; Horton & Dixon, 2018). Les MP peuvent aussi s’enfoncer et se déposer facilement sur les sédiments (Horton *et al.*, 2017). La persistance des MP dans les eaux marines entraîne, ingestion et toxicité chez les organismes marins tels que les bivalves.

Tableau 2. Quantification des MP dans différents compartiments (eau de surface, sédiments marins et biote) de l’environnement marin. Ces données ont été acquises sur les secteurs géographiques européens et français. Les données (sur fond gris) correspondent à des études réalisées sur un secteur proche des Pertuis Charentais.

Compartiments	Sites d'étude	Concentrations	Classe de taille	Références
Eau de surface	NW Méditerranée	2,28 mg/m ² ($\approx 0,023$ mg/L)	> 333 μ m	Collignon <i>et al.</i> , 2012
	Gire atlantique	2,67 mg/m ³	> 150 μ m	Reisser <i>et al.</i> , 2015
	Côtes suédoises	2 400 MP/m ³	> 80 μ m	Norén, 2007
	Côtes Européennes	501 MP/m ³	< 10-1 000 μ m >	Enders <i>et al.</i> , 2015
	Méditerranée/ Adriatique	10 432 g/km ² ($\approx 0,026$ mg/L)	> 700 μ m	Suaria <i>et al.</i> , 2016
	Mer du Nord	1 770 MP/L	> 80 μ m	Dubaish & Liebezeit, 2013
	Mer du Nord	245,4 MP/m ³	< 500 μ m	Lorenz <i>et al.</i> , 2019
	Baie de Brest	55 255 \pm 73 475 MP/km ²	> 333 μ m	Frère <i>et al.</i> , 2017
	Côtes espagnoles (Nord)	176 000 \pm 278 000 MP/km ²	> 333 μ m	Gago <i>et al.</i> , 2015
	SE Golfe de Gascogne	210 477 \pm 139 418 MP/km ²	> 500 μ m	Santos <i>et al.</i> , 2019
Sédiments marins	Belgique	390 MP/kg	> 38 μ m	Claessens <i>et al.</i> , 2011
	Méditerranée	101-897 MP/kg	X	Alomar <i>et al.</i> , 2016
	Manche	481 MP/kg	X	Maes <i>et al.</i> , 2017
	Baie de Brest	0,97 \pm 2,08 MP/kg	1,6 μ m-5 mm	Frère <i>et al.</i> , 2017
	Côtes espagnoles (Nord)	800 MP/kg	1,6 μ m-5 mm	Woodall <i>et al.</i> , 2014
	Côtes espagnoles (Nord)	150 MP/kg	1,6 μ m-5 mm	Sanchez-Vidal <i>et al.</i> , 2018
Biote	Bretagne	0,47 \pm 0,16 MP/g (<i>C. gigas</i>)	X	Van Cauwenbergh & Janssen, 2014
	Côtes atlantiques	2,1 \pm 1,7 MP/ind (<i>C. gigas</i>)	> 12 μ m	Phuong <i>et al.</i> , 2018b
	Côtes espagnoles (Nord)	2,55 \pm 2,80 MP/g (<i>Mytilus sp.</i>)	> 0,7 μ m	Reguera <i>et al.</i> , 2019
	Côtes espagnoles (Nord)	1,20 \pm 0,45 MP/ind (<i>Scyliorhinus canicula</i>)	0,38-3,1 mm	Bellas <i>et al.</i> , 2016

1.4 Les conséquences des microplastiques sur les écosystèmes marins.

Les potentiels impacts des MP sur les écosystèmes littoraux, marins et océaniques, sont des problématiques internationales, étant donné les quantités et concentrations retrouvées dans tous les océans et mers du globe. Ces préoccupations se mesurent à l’échelle environnementale et écologique (e.g. impacts sur les écosystèmes et organismes marins), mais aussi à l’échelle agro-alimentaire et sanitaire (e.g. santé humaine) puisque les organismes marins ingèrent ces particules et les transmettent dans leurs réseaux trophiques, et ce, potentiellement, jusqu’à l’Homme (Carbery *et al.*, 2018). Par conséquent, cela questionne également les enjeux économiques associés à l’élevage et au commerce des ressources marines (aquaculture, pêche, etc.). De 2016 à 2018, la recherche sur les MP est entrée dans une phase de développement rapide. Au cours de ces années, 921 articles ont été publiés, représentant 81 % de tous les résultats de recherche et un volume de publication moyen de 307 articles par an (Yu *et al.*, 2020a). Le mot clé le plus représenté, à travers la thématique générale des microplastiques, était « environnement marin ».

La contamination par les MP a été observée chez plusieurs espèces animales à différents niveaux trophiques (Figure 22) : mammifères marins (Hernandez-Gonzalez *et al.*, 2018), oiseaux (Laist, 1997 ; Jambeck *et al.*, 2015 ; Amélineau *et al.*, 2016), poissons (Avio *et al.*, 2017), crustacés (Cau *et al.*, 2019) et bivalves (Van Cauwenberghe & Janssen, 2014 ; Beyer *et al.*, 2017). Les conséquences de cette contamination peuvent avoir un effet toxique direct (Alimba & Faggio, 2019 ; Wang *et al.*, 2020d ; Pannetier *et al.*, 2019, 2020 ; Le Bihanic *et al.*, 2020 ; Cormier *et al.*, 2021) ou indirect *via* le relargage de toxiques comme des polluants organiques persistants (POP ; Frère, 2017 ; Phuong, 2018), des pesticides (Teuten *et al.*, 2007) mais aussi métaux, additifs ou le transport de micro-organismes potentiellement pathogènes (Frère, 2017). Une accumulation le long de la chaîne alimentaire est aussi possible (Nelms *et al.*, 2018 ; Thompson *et al.*, 2004).

How plastics enter the food web

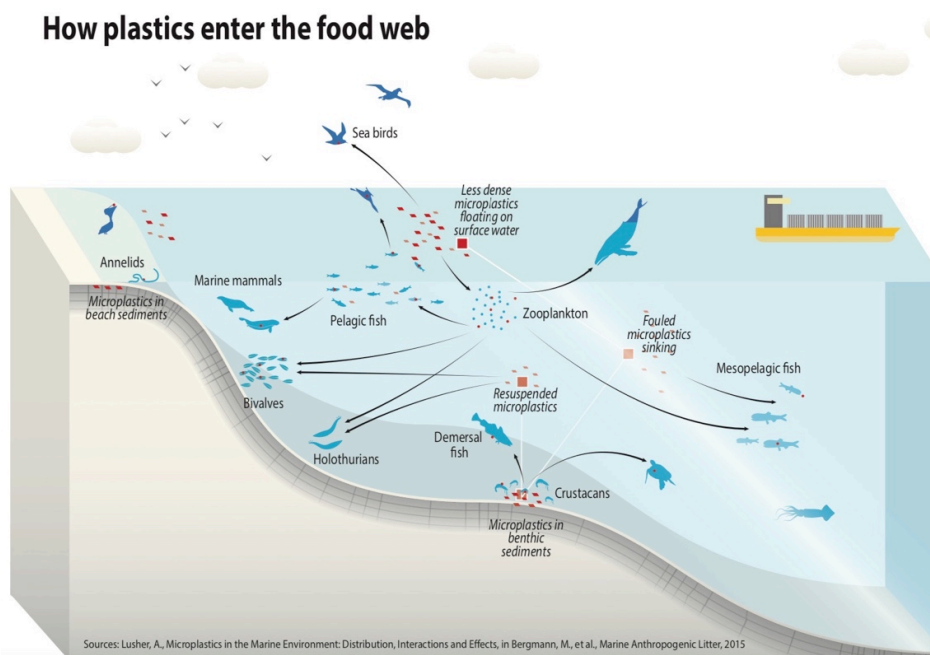


Figure 22. Différentes espèces du milieu marin sont impactées directement par les plastiques ou indirectement *via* la chaîne trophique. D’après Lusher (2015) et UNEP et GRID-Arendal (2016).

Les débris plastiques et MP peuvent parcourir de longues distances, influencés par les courants océaniques. Les exemples sont nombreux mais les plastiques peuvent voyager d’un continent à un autre, par exemple de l’Amérique jusqu’en Europe par le *Gulf Stream* (Galgani *et al.*, 2013b). Ces disséminations ont leur importance puisque de nombreuses espèces, telles que des bryozoaires, des mollusques ou encore des vers peuvent se fixer sur les débris puis coloniser de nouveaux milieux et se comporter comme des espèces non-indigènes/invasives (Pibot & Claro, 2012). Ainsi, ces espèces seraient susceptibles de perturber l’équilibre d’un écosystème en entrant en compétition avec des espèces partageant la même niche écologique (*e.g.* habitat, ressources).

De par leurs modes d’alimentation, les organismes filtreurs sont particulièrement exposés aux MP. Effectivement, les MP peuvent être filtrés par les branchies des bivalves. Ils peuvent aussi être capturés par des cils et transportés vers la partie ventrale et les palpes labiaux des filtreurs, pour être ingérés. Les MP peuvent alors rester dans le tube digestif, être éliminés ou traversés les membranes biologiques pour s’accumuler dans les tissus (Browne *et al.*, 2008). Il existe un lien direct entre la quantité d’eau de mer filtrée et l’exposition aux microparticules de plastiques : plus la quantité d’eau filtrée est importante et plus le nombre de MP filtré sera important et plus la probabilité d’en absorber sera élevée (Beyer *et al.*, 2017).

Sur le plan écologique, l’impact des MP se cumule avec celui des macroplastiques en termes d’encombrement spatiale pouvant conduire à une modification des habitats (Enders *et al.*, 2015). Lorsqu’ils sont ingérés par les organismes, ils sont responsables d’abrasions, d’obstructions et d’altérations des structures biologiques, impactant ainsi directement la survie des individus touchés (Wright *et al.*, 2013b). Les MP sont également sources de pollution chimique puisqu’ils constituent des vecteurs de transports de POP, de métaux lourds (Rochman *et al.*, 2013 ; Bakir *et al.*, 2014) et additifs (*e.g.* pigments, plastifiants, retardateurs de flamme, stabilisants, antistatiques ; Kwon *et al.*, 2017). En effet, le plastique une fois en mer, s’il n’est pas ingéré, va subir une dégradation physique, par les vagues et les UV, puis subir une dégradation biologique (Dussud & Ghiglione, 2014) menant à la production des MP (fragments inférieurs à 5 mm). Ces MP sont capables d’adsorber et de transporter des produits chimiques hydrophobes tels que les PCB et le DDT (Galgani, 2011) dont les effets nuisibles sont connus sur la faune marine (Castro *et al.*, 1991 ; Santos *et al.*, 2020). Malgré les risques que ces contaminations peuvent poser, et malgré l’intérêt croissant des scientifiques sur ce sujet, les impacts des MP sur les organismes sont encore trop peu documentés dans la littérature scientifique (Desforges *et al.*, 2014 ; Pannetier *et al.*, 2020) et certaines interrogations résident quant aux effets des plastiques usagés, ayant vieillis dans l’environnement marin.

Il a été observé que l’exposition aux MP pourrait entraîner une réduction significative de la croissance des microalgues (Besseling *et al.*, 2014 ; Sjollema *et al.*, 2016). Cependant, l’effet négatif des MP sur la croissance des algues semble être atténué à mesure que la taille des particules augmente (Zhang *et al.*, 2017). Les effets des MP, sur les producteurs primaires, sont importants à prendre en compte, afin d’étudier les organismes aquatiques trophiquement supérieurs, comme les bivalves (Wang *et al.*, 2019). Des effets physiques résultant de l’exposition aux MP peuvent comprendre l’attachement des microparticules aux surfaces externes (*e.g.* effets sur la mobilité et l’alimentation) ainsi que le colmatage du tube digestif pouvant provoquer une pseudo-satiété (Rehse *et al.*, 2016). Des effets indirects, sur les ressources énergétiques, la croissance et la reproduction, ont également été signalés (Booth & Sørensen, 2020). Dans l’ensemble, les effets les plus documentés (de Sá *et al.*, 2018), par la communauté scientifique, des MP sur les organismes marins comprennent: la réduction de l’activité alimentaire (de Sá *et al.*, 2015), le stress oxydatif (Della Torre *et al.*, 2014), la génotoxicité (Della Torre *et al.*, 2014), la neurotoxicité (Luis *et al.*, 2015 ; Ribeiro *et al.*, 2017), les retards de croissance

(Au *et al.*, 2015 ; Redondo-Hasselerharm *et al.*, 2018) ainsi que la réduction de la capacité de reproduction (Lee *et al.*, 2013 ; Au *et al.*, 2015 ; Cole *et al.*, 2015 ; Susarellu *et al.*, 2016). Des effets intergénérationnels pourraient aussi être mis en avant à la suite d’expositions longues aux MP.

Une étude récente a mis en évidence que des MP de PS (5-50 µm) perturbaient le métabolisme des glycolipides et de l’énergie chez les larves de *Danio rerio* (Wan *et al.*, 2019). Effectivement, une augmentation de 25 % de la consommation d’énergie avait été signalée après l’ingestion de MP de PS par *Mytilus edulis*, probablement associé à un effort pour digérer le matériel inerte (Van Cauwenberghe *et al.*, 2015). L’étude menée par Wright *et al.* (2013a) a montré que les vers marins (*Arenicola marina*) exposés au PVC, ont montré un épuisement des réserves lipidiques et énergétiques ainsi qu’une réponse inflammatoire, du potentiellement à une diminution de l’activité alimentaire. Une étude antérieure s’est polarisée sur une exposition de 21 jours aux MP de PE/PET sur les huîtres (*C. gigas*). Les MP testés ont inhibé le métabolisme lipidique, tandis que les activités enzymatiques du métabolisme énergétique étaient activées chez les huîtres (Teng *et al.*, 2021). Une exposition de 21 jours aux MP de PS (5 µm) en conditions contrôlées de laboratoire sur des crabes (*Eriocheir sinensis*) a induit un stress oxydatif dans l’hépatopancréas, justifié par le suivi de la SOD (Yu *et al.*, 2018). Des MP de PS ont été testés sur des nématodes (*Caenorhabditis elegans*) et des effets significatifs ont mis en évidence une combinaison d’impact sur le stress oxydatif et des lésions intestinales (Yu *et al.*, 2020c).

Des effets indésirables des MP/NP ont aussi été détectés sur le comportement. Dans l’étude menée par Chen *et al.* (2017), des NP de PS (50 nm) ont induit des altérations comportementales avec une hypoactivité chez les larves de *Danio rerio*. Le stress oxydatif et/ou les systèmes nerveux et visuels pourraient alors être affectés et déclencher des anomalies comportementales (Chen *et al.*, 2017). Des MP de PE (4-6 µm) dopés avec un cocktail de polluant organique (BaP+PFOS) ont montré des effets négatifs sur le comportement natatoire des larves de Medaka marin (*Oryzias melastigma*, Le Bihanic *et al.*, 2020). Les données issues de l’étude de Susarellu *et al.* (2016) ont conclu à un changement significatif de l’allocation d’énergie vers le maintien de l’organisme (*C. gigas*) et la croissance structurelle au détriment de la reproduction, à la suite d’une exposition de 2 mois aux MP de PS (2-6 µm). Des effets intergénérationnels ont été décrits sur la balane (*Amphibalanus amphitrite*) avec augmentation de la mortalité larvaire et des retards de développement (MP de PS, 1,7-19 µm, Yu & Chan, 2020). Bien qu’il existe une quantité croissante de données de toxicité pour des résultats empiriquement vérifiables (e.g. anomalies de développement, altération de la reproduction, altérations de l’histopathologie des organes, effets létaux) liées aux MP/NP, il reste une compréhension limitée de la mécanistique complexe à l’origine de ces effets (Alimba & Faggio 2019 ; Jeong & Choi 2019).

1.5 Les impacts des microplastiques sur l’huître creuse (*C. gigas*)

Des études écotoxicologiques ont montré une ingestion de MP dans un grande variété d’organismes aquatiques, y compris les organismes planctoniques, les invertébrés et les vertébrés (Ribeiro *et al.*, 2019). Cependant, peu d’études ont porté sur le modèle huître, capables de filtrer de grandes quantités d’eau et donc potentiellement d’accumuler les particules présentes. L’ingestion de particules de plastiques a été démontrée chez de nombreux organismes, que ce soit en conditions expérimentales ou de terrain. Elle a été mise en évidence en particulier chez des mollusques bivalves marins particulièrement prisés pour la consommation humaine, tels que *Mytilus edulis* et *Crassostrea gigas* (Van Cauwenberghe & Janssen, 2014). Les MP retrouvés dans les chairs des bivalves sont sous formes de fibres, de fragments, ou encore de granulés, mais les classes de tailles (Corami *et al.*, 2020)

et les formes de particules retrouvées varient significativement selon les tissus, et selon les espèces (Li *et al.*, 2015). Phuong *et al.* (2018b) ont montré que la contamination des bivalves par les MP peut varier en fonction de la saison, des espèces et du caractère sauvage ou cultivé des individus. Leur étude, réalisée sur le littoral du Pays de la Loire, à la fois sur des individus sauvages et des individus d'élevages, a révélé une présence majoritaire de MP de type PP et PE dans les chairs de *Mytilus edulis* et *Crassostrea gigas*. La présence de particules de MP dans les fruits de mer (Figure 23) pourrait poser un risque pour la santé humaine (Van Cauwenberghe & Janssen 2014 ; Bouwmeester *et al.*, 2015). Cependant, aucune étude n'a encore étudié ce qui arrive aux particules MP/NP une fois qu'elles pénètrent dans le tractus gastro-intestinal (Galloway, 2015 ; Yee *et al.*, 2021).

Dans une étude récente, menée par Graham *et al.* (2019), à la suite d'expositions contrôlées aux MP de PS (100-500 μm), des huîtres adultes ont été dépurées pendant 72 h, pendant lesquelles 84,6 \pm 2 % des particules absorbées ont été libérées dans les fèces tandis que 15,4 \pm 2 % ont été retenues à l'intérieur de la cavité de la coquille. Aucune particule de MP n'ont été trouvées dans les tissus mous des individus. L'étude portée par Sussarellu *et al.* (2016) a fourni des preuves que les particules de MP de PS (6 μm) pouvaient provoquer des modifications de l'alimentation et des perturbations de la reproduction chez les huîtres adultes, exposées durant deux mois en conditions expérimentales avec des impacts négatifs significatifs sur la génération F1 au stade larvaire (effets intergénérationnels). Suite à une exposition de 80 jours de juvéniles d'huître (Thomas *et al.*, 2020), avec les mêmes microbilles de PS (6 μm), les cinétiques d'ingestions ont été analysées. À partir de l'analyse histologique, des MP ont été détectés dans les intestins des huîtres exposées et dans les tubules digestifs, mais aucune caractéristique inflammatoire tissulaire n'a été observée au fil du temps. Le poids et la longueur de la coquille sont restés comparables entre les différents traitements et témoins. Cependant, une étude récente a mis en évidence des non-effets des NP de PS sur deux générations d'huîtres (*C. gigas*). Des effets sur la croissance larvaire ont été détecté sur la génération F1 mais aucun effet n'a été visualisé sur la génération F2 (Tallec *et al.*, 2021).

Beaucoup d'études antérieures se sont basées sur des concentrations relativement plus fortes que celles retrouvées dans l'environnement marin. Revel *et al.* (2020), se sont intéressés aux potentiels effets de MP de PE et PP à des concentrations proches de l'environnement (0 ; 0,008 ; 10 et 100 $\mu\text{g MP.L}^{-1}$) sur une exposition de 10 jours, suivie d'une période de dépuration de 10 jours dans de l'eau de mer filtrée. Des MP ont été détectés dans les biodépôts (cumul des fèces et pseudo-fèces) d'huître, par microscopie infrarouge, à la suite de l'exposition à toutes les concentrations testées. De plus, aucun MP, n'a été observé dans les tissus des huîtres exposées. Aucune modulation significative des biomarqueurs n'a été détectée dans les organismes exposés aux MP dans des conditions environnementales contrôlées pertinentes (Revel *et al.*, 2020).

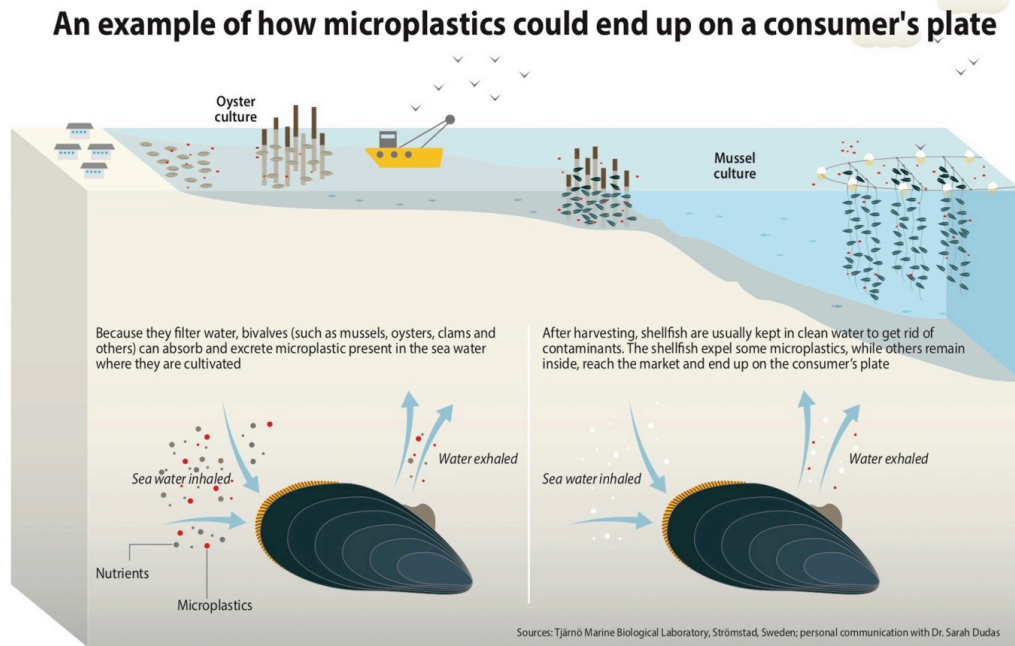


Figure 23. Potentielle ingestion de particules de plastiques par les bivalves. D’après UNEP et GRID-Arendal (2016).

De récentes études ont montré que des MP peuvent affecter les stades précoces de développement des bivalves. Les stades précoces de développement sont les stades les plus sensibles aux aléas de l’environnement et aux potentiels pollutions et contaminations du milieu (Gamain, 2016). Cole & Galloway (2015) ont démontré l’ingestion de particules de MP/NP de PS de 70 nm à 20 µm chez des larves-D de *C. gigas* âgées de 3 à 24 jours après fécondation. Cependant, malgré l’ingestion observée par les larves-D, l’exposition à des concentrations de NP et MP supérieures à celles observées dans le milieu marin, n’a entraîné aucun effet mesurable sur le développement, la croissance ou la capacité d’alimentation des larves pendant la durée de l’étude.

Alors que la détection et la quantification des NP dans l’environnement restent un défi, certaines études commencent à s’y intéresser et montrent des effets significatifs sur les bivalves à des stades précoces de développement. Les NP de PS ont induit une diminution significative du succès de la fécondation et du développement embryonnaire et larvaire avec de nombreuses malformations jusqu’à l’arrêt total du développement (Tallec *et al*, 2018). Ces résultats soulignent que les expositions aux NP peuvent avoir des effets délétères sur les stades précoces des huîtres, interagissant vraisemblablement avec les membranes biologiques et pouvant provoquer une cytotoxicité avec des conséquences potentiellement dramatiques pour le succès de la reproduction. Les résultats de l’étude de González-Fernández *et al*. (2018) ont démontré l’adhésion des NP à la surface des spermatozoïdes et des ovocytes d’huître, préalablement exposés durant 1, 3 et 5 h à des NP de PS. Ces résultats démontrent que les effets des NP se produisent rapidement et semblent complexes.

1.6 Les plastiques utilisés en aquaculture

Ce n’est qu’à partir de 1970, à la suite du développement économique des sociétés modernes, qu’émergent les premières préoccupations liées aux déchets et plus particulièrement aux déchets plastiques (Rocher, 2008 ; Dupré, 2013). Peu d’études se sont intéressées aux matériaux plastiques

utilisés en aquaculture ou pour les activités de pêche. Cependant, les matériaux et outils utilisés par les professionnels de la filière aquacole sont les plus à même d’être au contact des bivalves, lors des phases de production et de captage en milieu marin. Les engins de pêche abandonnés, perdus ou rejetés sont considérés comme la principale source de déchets plastiques par les secteurs de la pêche et de l’aquaculture, mais leur contribution relative n’est pas bien connue aux niveaux régional et mondial (Lusher *et al.*, 2017). Les secteurs de l’aquaculture et de la conchyliculture se sont diversifiés et ont explosé avec l’accroissement des exportations. Le commerce international des fruits de mer représente environ 9 % des exportations agricoles totales (FAO, 2016). D’un point de vue historique, l’ostréiculture utilisait des outils lourds et fragiles. Par exemple jusqu’au années 80, pour le captage des naissains, des tuiles et ardoises, étaient installés afin que les larves pédivéligères viennent se fixer dessus (Berthomé *et al.*, 1981). Les coûts économiques ainsi que les efforts physiques et psychologiques étaient importants pour les professionnels, lors de l’utilisation de ces matériaux lourds. Par la suite, ces matériaux ont été remplacés par des dispositifs en plastique. Dans les années 1970, les premiers collecteurs plastiques ont fait leur apparition : les tubes rigides, longs de 1,20 m et de 2 à 2,5 cm de diamètre, à la surface granuleuse ou rainurée (en PVC et de couleur gris). Ils ont connu un très grand succès et sont encore employés de nos jours. D’autres collecteurs plastiques ont également été développés mais ils ont eu un succès moindre : les lamelles, fines barres de plastiques de 60 cm de long sur 5 cm de large, assemblées par 5 sur des tiges transversales rigides (on en trouve encore en peu aujourd’hui dans le Bassin d’Arcachon), ou encore des plaques rondes de plastique rainurées, des cadres grillagés, qui sont les ancêtres des fameux plénos et coupelles collectrices actuels (Toulhoat, 2008). Les plastiques sont utilisés parce c’est un matériau bon marché et durable, et peuvent être facilement achetés entretenus ou remplacés (Lusher *et al.*, 2017).

Le Bassin de Marennes-Oléron, plus que les autres bassins ostréicoles français, s’est toujours caractérisé par l’utilisation d’une grande variété de collecteurs (Grelon, 1978). Une récente étude, s’est intéressé aux effets des éluviats de plastiques environnementaux utilisés en aquaculture sur les stades précoces de développement de l’huître perlière, *Pinctada margaritifera* (Gardon *et al.*, 2020). Aujourd’hui, les principaux plastiques utilisés par la profession ostréicole sont : la coupelle (PP ou PE) et le tube de captage (PVC), ainsi que la poche ostréicole (HDPE ; Figure 24).

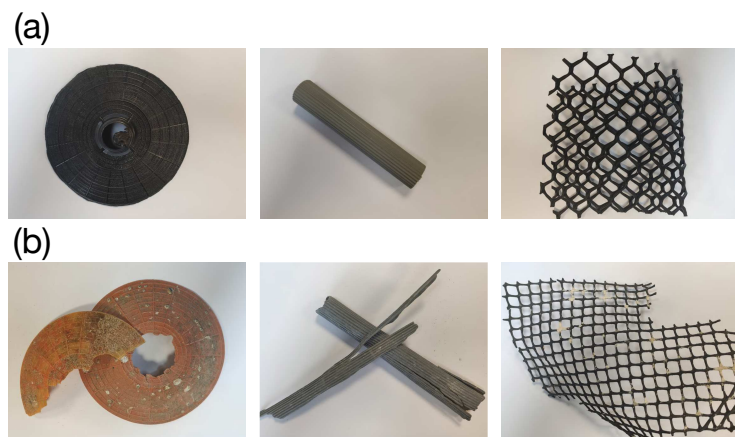


Figure 24. Photographies des trois principaux plastiques ostréicoles utilisés par les professionnels et potentiellement retrouvés sur les littoraux (la coupelle, le tube de captage et la poche ostréicole). **(a)** Plastiques ostréicoles neufs et **(b)** vieillis dans l’environnement des Pertuis Charentais. Photographies réalisés lors des prélèvements sur le littoral charentais (© Arno Bringer).

Ces dispositifs plastiques ostréicoles sont régulièrement retrouvés sur les littoraux et les plages, suite, aux grandes marées, aux détachements et pertes lors de manipulation et lors de phénomènes climatiques extrêmes (e.g. tempêtes, vents violents, vagues).

2. *Les produits phytosanitaires : pesticides*

2.1 *Généralités*

Les pesticides sont des substances, utilisées de manière préventive ou en curative, dans l’agriculture moderne, pour limiter la prolifération et/ou l’impact des nuisibles sur les cultures, ils sont donc qualifiés de substances biocides (Ministère de la transition écologique et solidaire, 2021). D’après le Journal officiel de l’Union européenne, les produits pesticides sont : « les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l’utilisateur, qui sont destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l’action ou à les combattre de toute autre manière, par une action chimique ou biologique. » (Journal officiel de l’Union Européenne, 1998).

Les pesticides sont classés en fonction du type d’organismes/maladies contre lequel il lutte, ainsi les herbicides sont contre les adventices, les fongicides contre les champignons, et les insecticides contre les insectes (Levet *et al.*, 2008 ; Ministère de la transition écologique et solidaire, 2021). Bien que les pesticides soient majoritairement utilisés dans l’agriculture, ils sont également largement utilisés au quotidien dans l’entretien de la voirie, des jardins, ou des cimetières mais également au domicile des particuliers dans les répulsifs à insectes par exemple (Levet *et al.*, 2008 ; ZéroPesticide, 2017). Étant donné leur large domaine d’utilisation, les pesticides sont d’un point de vue chimique de nature très variée (Ministère de la transition écologique et solidaire, 2021).

2.2 *Les pesticides des Pertuis Charentais*

2.2.1 *Pesticides et ostréiculture*

En 2017, les ventes de produits phytosanitaires de type pesticide, à destination des professionnels, ont été évaluées à 3 968 tonnes de produits commerciaux. La Charente-Maritime est le second département de Nouvelle-Aquitaine en termes de vente de pesticides, derrière la Gironde et juste devant la Charente (Lafargue *et al.*, 2019). En 2016, la Charente-Maritime se situait en troisième position du département français ayant le plus acheté de Glyphosate, avec 281 tonnes (EauFrance, 2016). Fin 2019, un arrêté a été émis par le maire de la ville de La Rochelle pour stopper l’utilisation du Glyphosate et des pesticides de synthèse, utilisés par les agriculteurs mais aussi pour l’entretien des voies ferrées et routières (France 3, 2019).

Dans les années 1980, il a été montré, que les quantités d’eau douce apportées par les fleuves pouvaient entraîner une dessalure brutale pouvant affecter la physiologie et la qualité gustative des huîtres creuses (Masson, 1997 ; Chevalier & Masson, 1988). De plus, les apports terrigènes des fleuves dans les espaces littoraux et côtiers peuvent potentiellement apporter des substances phytosanitaires, utilisées en agriculture plus en amont (Lazure & Jegou, 1998 ; Loyer, 2001 ; Dabrin, 2009 ; Strady, 2010 ; Soletchnik *et al.*, 2015). Dans le bassin de Marennes-Oléron, les herbicides représentent 75 % du volume total des produits phytosanitaires et les apports sont essentiellement printaniers (avril-juin ; Munaron, 2004). En sortie de Seudre, des pics de concentrations significatifs

ont été enregistrés, proches de certains parcs ostréicoles du secteur du Bassin de Marennes-Oléron (Soletchnik *et al.*, 2005a ; Burgeot *et al.*, 2007). Des concentrations importantes en pesticides ont aussi été mesurées au niveau des débouchés de marais littoraux, au sud de la Charente (Masson & Dubernet, 2006). Il a été détecté simultanément jusqu’à onze molécules dans le secteur de Marennes-Oléron, représentant des concentrations de près de 20 µg.L⁻¹ de pesticides (Munaron, 2004). Une étude antérieure (Arzul & Quiniou, 2014) a confirmé la toxicité aigüe de cocktails de pesticides, tant sur les algues que sur les mollusques bivalves marins.

Plusieurs études (Soletchnik, 2002 ; Soletchnik *et al.*, 2005b) ont mis en lumière une concomitance entre les périodes de détection d’herbicides en grande quantité dans l’eau interstitielle du sédiment et la période de gamétogénèse de l’huître (juin-août). Auby *et al.* (2007), ont montré un dysfonctionnement physiologique des huîtres creuses en période de maturation, en présence de pesticides. De plus, l’accumulation des pesticides dans le sédiment à proximité des poches ostréicoles sur des tables, présenterait un danger pour les huîtres de Marennes-Oléron (Soletchnik *et al.*, 2005b). Les habitats aquatiques sont particulièrement exposés à la contamination par les pesticides, par ruissellement, lessivage, dérive de pulvérisation ou déversements accidentels (Renault, 2011). Les niveaux de pesticides mesurés dans les eaux superficielles sont généralement inférieurs aux concentrations létales pour les espèces aquatiques. Cependant, des effets néfastes sublétaux peuvent résulter d’une exposition à ces produits à des concentrations pertinentes pour l’environnement, notamment sur des stades précoces de développement, comme les larves-D chez l’huître creuse (Akcha *et al.*, 2012 ; Mottier *et al.*, 2013 ; Mai *et al.*, 2013 ; Mai *et al.*, 2020).

2.2.2 Les réseaux de surveillances et suivis de pesticides

De nombreux réseaux de surveillance et de suivis de l’état écologique des milieux sont identifiés sur le territoire national, afin de garantir une « bonne » qualité de l’eau. Sur le secteur des Pertuis Charentais : le Réseau de Contrôle de Surveillance (RCS) des eaux littorales (Agence de l’eau Adour Garonne) ; le réseau de suivi de la qualité des eaux de baignades naturelles et pêche à pied de loisir (Agence Régionale de la Santé) ; les réseaux de surveillance REMY, REPHY, ROCCH et REPOM (Ifremer) ; le réseau de suivi de la qualité de l’eau des marais et de la qualité des eaux conchylicoles (Département 17 de la Charente-Maritime) ; le réseau conchylicole en marais salé (CREAA) ; le réseau national de surveillance de la qualité des eaux et des sédiments des ports maritimes (DDTM 17), font partie des nombreux réseaux en activités pour apporter des données et des suivis réguliers. Pour compléter ces réseaux, le SOMLIT (Service d’observation en milieu littoral) permet depuis les années 90, un suivi multi-sites national des paramètres physico-chimiques dans les eaux côtières.

Le ROCCH, réseau d’observation de la contamination chimique, a pour objectifs d’évaluer les niveaux et tendances de la contamination chimique ainsi que la surveillance chimique sanitaire des zones de production conchylicoles classées. Il a pris en 2008 la suite du Réseau National d’Observation (RNO) qui existait depuis 1974 (DDTM, 2016).

Les moules et les huîtres sont ici utilisées comme indicateurs quantitatifs et qualitatifs de contamination. Ces mollusques possèdent, en effet, comme de nombreux organismes vivants, la propriété de concentrer certains contaminants présents dans le milieu où ils vivent (*e.g.* métaux, contaminants organiques hydrophobes) de manière proportionnelle à leur exposition. Ce phénomène de bioaccumulation peut être assez lent et peut nécessiter, en fonction des contaminants, plusieurs mois de présence du coquillage sur site pour que sa concentration en contaminant soit équilibrée avec celle de la contamination du milieu ambiant. On voit donc l’avantage d’utiliser ces bioindicateurs

plutôt que le dosage direct dans l’eau : concentrations beaucoup plus élevées que dans l’eau facilitant la détection et la quantification des contaminants ; représentativité de l’état chronique du milieu permettant de s’affranchir des fluctuations rapides de celui-ci (Ifremer, 2018). Cependant ce réseau de surveillance ne prend en compte uniquement les métaux, HAP, PCB et quelques pesticides organochlorés (2 fois/an). Les pesticides ne sont donc pas suivis par les réseaux Ifremer.

En 2014, afin d’améliorer les réseaux de suivi, le Conseil Départementale de la Charente-Maritime (CD 17), en lien avec le CRC 17, mettent en place le réseau de suivi de la qualité des zones de production conchylicole (DDTM, 2016). Ce programme vient en complément des suivis réglementaires réalisés par l’Ifremer et cible exclusivement les secteurs déclassés ou présentant des risques importants de déclassement. Il a pour principaux objectifs de répondre aux problèmes de dégradations constatés sur certains secteurs conchylicoles et d’améliorer les connaissances sur l’impact potentiel dans les coquillages de certaines substances chimiques non suivies à ce jour (pesticides notamment). Les points de suivi sont déterminés en concertation avec le CRC 17. Le laboratoire Qualyse (La Rochelle) est alors mandaté pour effectuer les prélèvements et les analyses avec l’aide technique du CRC 17. Le suivi s’effectue sur trois matrices différentes : eau, sédiment et coquillage. Dans le cadre des travaux présentés dans ce manuscrit de thèse, certaines données ont été extraites des suivis portés par le CD 17, en accord avec les chargées de missions. En 2018, une liste d’une soixantaine de molécules phytosanitaires a été sélectionnée, dans le cadre de ces suivis, avec notamment la présence des trois pesticides d’intérêt, qui seront décrits ci-après, et nombreux autres pesticides plus connus (Diuron, Isoproturon, Epoxiconazole, Metazachlore, Nicosulfuron, Chlortoluron, Atrazine, Boscalid, Métolachlore, Acide aminométhylphosphonique, etc.).

2.2.3 Les pesticides d’intérêt de cette étude

Dans le cadre de ces travaux de thèse, une liste non-exhaustive a été dressée en concertation avec le Parc Naturel Marin de l’Estuaire de la Gironde et de la Mer des Pertuis. Dans le Tableau 3, nous avons dressé une liste de pesticides, régulièrement utilisés et retrouvés dans les eaux fluviales et côtières des Pertuis Charentais. Par la suite, des données complémentaires (e.g. concentrations maximales dosées, ventes aux agriculteurs, interdiction d’usage), nous ont permis de sélectionner (marquage jaune) trois pesticides d’intérêt, pour nos travaux. De plus, ces trois pesticides, présentent un faible contenu en termes d’effets toxicologiques, publié par la communauté scientifique.

Durant cette thèse, deux herbicides (Nicosulfuron et Chlortoluron) et un fongicide (Boscalid) ont été étudiés, afin de représenter la contamination pesticide sur le secteur des Pertuis Charentais. Des concentrations maximales ont été retrouvées au niveau de la Sèvre Niortaise (Baie de l’Aiguillon), pour le Nicosulfuron ($0,17 \mu\text{g.L}^{-1}$), Chlortoluron ($0,18 \mu\text{g.L}^{-1}$) et Boscalid ($0,13 \mu\text{g.L}^{-1}$) durant les suivis annuels de 2017 à 2020.

Tableau 3. Liste des principaux pesticides détectés dans les Pertuis Charentais. Les trois pesticides surlignés en jaune sont les pesticides sélectionnés pour ce travail de thèse. Les concentrations maximales détectées dans les fleuves des Pertuis Charentais sont exprimées en $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les données de ventes en Charente-Maritime (2015-2017) sont exprimées en kg. Ces données sont issues de Léonard, 2017 ; Recema, 2017 ; Action program, Coastal water quality in shellfish growing areas, Qualyse, CD 17, 2020.

Substances	Usages	Interdiction	Sèvre Niortaise	Seudre	Ventes
Métolachlore	Herbicide (maïs, tournesol)	30/12/03	1,97	0,29	164 640
Diflufénicanil	Herbicide (blé, orge)	X	X	X	24 112
Métazachlore	Herbicide (colza, tournesol)	31/07/21	0,04	0,011	62 069
Nicosulfuron	Herbicide (maïs)	X	0,17	0,041	5 493
Chlorpyrifos	Insecticide (colza, vigne)	X	X	X	8 077
Pendiméthaline	Herbicide (blé, colza, tournesol, maïs, orge)	X	X	X	139 310
Cyperméthrine	Insecticide (blé, colza, maïs, vigne)	X	X	X	X
Chlortoluron	Herbicide (blé, orge)	X	0,18	0,14	232 540
Mancozébe	Fongicide (vigne)	X	X	X	268 251
Boscalid	Fongicide (viticulture, arboriculture, maraichage)	X	0,13	X	15 753
Diméthénamide	Herbicide (maïs)	X	0,96	0,079	20
Chlorothalonil	Fongicide (céréales, légumes et vignes)	X	X	X	115 692

Le Nicosulfuron 2-(((4,6-diméthoxy-(2-pyrimidinyl)amino)carbonyl)amino)sulfonyl)-N,N-diméthyl-3-pyridinecarboxamide, est un composant chimique utilisé comme herbicide. Ce produit phytosanitaire est généralement actif contre les graminées. Le Nicosulfuron est un herbicide de la famille des sulfonyl-urées (Figure 25 ; Ineris, 2013). Avec un $K_{o/w}$ égal à 0,61 (20 °C ; EFSA, 2007) et une solubilité de 7 500 mg.L^{-1} (20 °C, pH 6,5 ; EFSA, 2007), la substance présente un faible potentiel de bioaccumulation chez les organismes aquatiques (US-EPA, 2011) et un caractère plutôt hydrophile.

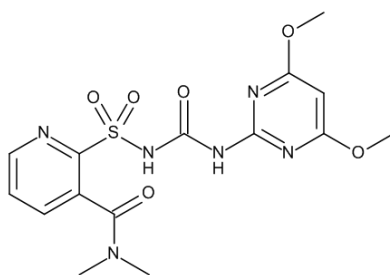


Figure 25. Formule chimique de la molécule de Nicosulfuron.

Différentes études ont pu mettre en évidence les effets, assez faibles, du Nicosulfuron sur les densités de populations de microalgues (Seguin *et al.*, 2001 ; Le Boulanger *et al.*, 2001). De plus, une étude a mis en évidence un effet du Nicosulfuron sur les activités d’acétylcholinestérase sur les activités neuronales et musculaires chez le poisson rouge, *Cariassus auratus* (Bretaud *et al.*, 2000).

Le Chlortoluron (3-(3-chloro-p-tolyl)-1,1-diméthyl urée) est une substance active de produit phytosanitaire qui a aussi un effet herbicide. Son principal produit de dégradation est le 3-(3-chloro-p-tolyl)-1-méthylurée. Ils appartiennent à la famille chimique des urées substituées (Ineris, 2013 ; Figure 26).

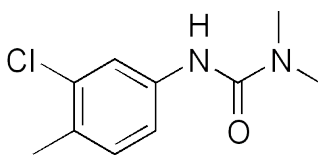


Figure 26. Formule topologique de la molécule de Chlortoluron.

Le Chlortoluron est largement utilisé pour lutter contre les mauvaises herbes dans les cultures de céréale, de coton et les cultures fruitières (Lechón *et al.*, 1997). Il agit par inhibition de la photosynthèse (Haglund, 1997) et est actuellement considéré comme un contaminant à long terme des écosystèmes d’eau douce (Valiente Moro *et al.*, 2012). En France, son utilisation est autorisée dans la composition de préparations bénéficiant d’une autorisation de mise sur le marché. Peu d’études scientifiques se sont intéressées au Chlortoluron, mais des premiers effets ont été détectés sur les microalgues et phytoplancton, avec des impacts significatifs sur la croissance (Anton *et al.*, 1993 ; Valiente Moro *et al.*, 2012). Avec un $K_{o/w}$ égal à 2,5 et une faible solubilité dans l’eau (74 mg.L^{-1} à 25 °C ; Sanco, 2005), le Chlortoluron est une molécule lipophile, qui a tendance à se fixer dans les graisses et que ne se dissout que très peu en milieu aqueux. De plus, le Chlortoluron est difficilement biodégradable. Ses caractéristiques physiques et chimiques font de cette molécule un contaminant persistant de l’environnement.

La Boscalid, 2-Chloro-N-(4'-chlorobiphenyl-2-yl) nicotinamide (Figure 27), est un fongicide de la famille des carboxamides utilisé, notamment, dans le traitement des champignons pathogènes. Son mode d’action principal est l’inhibition de la production d’ATP mitochondriale dans les cellules cibles.

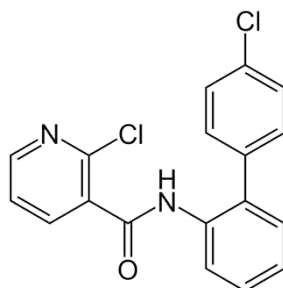


Figure 27. Formule topologique de la molécule de la Boscalid.

Elle possède un coefficient de partage octanol/eau ($K_{o/w}$), de 2,96 à pH 7,1 et 21 °C (E.C., 2008 ; US-EPA, 2003 ; US-EPA, 2010), ainsi qu’une hydrosolubilité de $4,6 \text{ mg.L}^{-1}$ à 20 °C (E.C., 2008). Elle sera considérée, comme assez peu lipophile (hydrophobe), du fait que son coefficient de partage est supérieur à 2,2 (Margoum, 2015).

Après application, les fongicides peuvent être transportés dans les eaux de surface et souterraines et finalement pénétrer dans les milieux estuariens et marins. Les informations écotoxicologiques sur la Boscalid pour les organismes aquatiques marins sont rares. Une étude (Qian *et al.*, 2018) a porté sur les effets de la Boscalid sur une espèce algale d’eau douce (*C. vulgaris*). Les résultats obtenus indiquent que la croissance des algues et la teneur en chlorophylle et en caroténoïdes étaient considérablement inhibées. Il a été montré que la photosynthèse et le métabolisme énergétique étaient aussi impactés. D’après une étude de Vu *et al.* (2016), la survie, la croissance et les réserves

énergétiques de l’amphipode marin, *Allorchestes compressa*, ont été affectées négativement par des expositions à la Boscalid, avec des effets dose-dépendant.

D’après le Tableau 4, des valeurs et seuils réglementaires (Ineris, 2013) sont décrits pour les composants phytosanitaires régulièrement retrouvés dans les milieux aquatiques. Pour les trois pesticides d’intérêt choisis, des MACs (Concentration Maximale Acceptable dans l’eau de mer) sont évalués, respectivement de 0,017 ; 0,2 et 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour le Nicosulfuron, Chlortoluron et Boscalid. Ces concentrations ont été testées au cours des travaux présentés dans le Chapitre IV (*cf.* Article 4) de ce manuscrit.

Tableau 4. Seuils de concentrations réglementaires des trois pesticides d’intérêt (Nicosulfuron, Chlortoluron et Boscalid) sur le secteur des Pertuis Charentais (Ineris, 2013).

Substance	N°CAS	Log Kow	Koc ($\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$)	PNEC ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	MAC _{marine} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	NQE _{marine} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Nicosulfuron	111991-9-4	0.61	34-135.6	$3,5\cdot 10^{-5}$	17	$3,5\cdot 10^{-3}$
Chlorotoluron	15545-48-9	2.5	108-384	0.01	0.2	0.1
Boscalid	188425-85-6	2.96	507-1,110	12.5	10	/

Légende :

N°CAS : Chemical Abstracts Service Numbers.

Kow : coefficient de rapport octanol/eau (caractère hydrophile ou hydrophobe).

Koc : coefficient de rapport carbone organique/eau ((capacité de la molécule à être adsorbée ou désorbée sur la matière organique).

PNEC : Concentration sans effet prévisible sur l’environnement.

MAC_{marine} : Concentration maximale acceptable dans l’eau de mer.

NQE_{marine} : Norme de qualité environnementale en eau de mer.

2.3 Les effets des pesticides sur différents modèles d’études aquatiques

2.3.1 Les effets des pesticides d’intérêt de cette étude sur les organismes aquatiques

Très peu d’études se sont intéressées aux effets des trois pesticides sélectionnés sur les mollusques bivalves marins. Cependant, quelques études antérieures ont été menées sur d’autres modèles d’études aquatiques, et sont présentées dans cette partie.

Concernant le Nicosulfuron, une étude (Saglio *et al.*, 2003) a décrit les effets de cet herbicide sur le comportement de nage du poisson rouge (*Carassius auratus*). À des concentrations testées entre 25 et 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, des effets significatifs ont été observés sur la nage en groupe et sur le regroupement comportemental. En raison du faible taux d'application requis pour le Nicosulfuron en agriculture (Yoshii, 2004), le risque de contamination du milieu aquatique apparaît théoriquement faible. Cependant, avec l’intensification des activités agricoles, de nouvelles études doivent être effectuées afin de mieux comprendre les effets de cet herbicide. Des effets importants du Nicosulfuron ont été observés sur le même modèle d’étude à un stade juvénile (Bretaud *et al.*, 2000). Des inhibitions significatives de l'activité cérébrale de l'acétylcholinestérase ont été relevées en réponse au Nicosulfuron à 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ après 24 et 48 h d’exposition. De plus, une étude plus récente a mis en évidence la formation rapide de produits de dégradation du Nicosulfuron (Carles *et al.*, 2018), dans des environnements aquatiques. Dans l'ensemble, ces résultats soulignent la nécessité de prendre en

compte le principe actif et les métabolites dans leur ensemble pour la détermination du devenir dans l'environnement et de la toxicité des mélanges de pesticides.

Des travaux portant sur le Chlortoluron ont permis de montrer un effet inhibiteur significatif sur la croissance de l'algue d'eau douce *A. Coffeaeformis*, à une concentration de 80 µg.L⁻¹ (Valiente-Moro *et al.*, 2012). Les résultats de cette étude ont également confirmé que les cultures de microalgues sont clairement affectées par une exposition aiguë et chronique aux herbicides et notamment au Chlortoluron (Valiente-Moro *et al.*, 2012). Certains effets des organophosphates et des phénylurées (famille du Chlortoluron) ont pu être observés sur la structure et le fonctionnement des biofilms fluviaux bactériens et algaux (Ricart *et al.*, 2010). Cependant des analyses en laboratoire contrôlées doivent être effectuées afin de confirmer ces résultats. L'étude portée par Arrhenius *et al.* (2004), a montré l'effet des pesticides de la famille des phénylurées sur l'inhibition de la photosynthèse dans des tests à court terme utilisant l'incorporation de carbone radiomarqué sur deux espèces de microalgues marines. Présent dans les chloroplastes chez les algues, la co-enzyme plastoquinone du photosystème II, semble impactée par l'action de cette famille d'herbicide, agissant sur l'action de la photosynthèse (Bérard & Pelte, 1999).

Suite à une exposition de 28 jours, à des concentrations de Boscalid, détectées dans l'environnement (Vu *et al.*, 2016), de 0 ; 0,01 ; 0,1 et 1 mg.L⁻¹, certains effets ont été observés (*i.e.* survie, croissance, réserve énergétique, reproduction, teneurs en lipides) sur le poisson zèbre (*Danio rerio*). Qian *et al.*, (2019), ont indiqué que la Boscalid inhibait la croissance du poisson zèbre et induisait des dommages aux reins et au foie. De même, l'expression des gènes liés au métabolisme des glucides et des lipides dans le foie et l'intestin a été affectée par la Boscalid. Il a été constaté que la Boscalid inhibait significativement la capacité locomotrice et la réponse phototactique des larves (*D. rerio*) après une exposition de 8 jours, et altérait l'activité locomotrice et les trajectoires de prédation chez les adultes après une exposition de 21 jours (Qian *et al.*, 2021). De plus, il a été montré qu'une exposition de 48 h à la Boscalid effectuée sur des embryons de poissons zèbre, était capable d'induire un stress oxydatif et modifier l'activité de l'ATPase, ce qui à son tour influence l'expression des gènes impliqués dans le développement neurologique (Wang *et al.*, 2020b). Autre résultat important, la Boscalid est capable d'induire des anomalies dans le comportement natatoire des larves de poissons (Wang *et al.*, 2020b). Dans une étude réalisée par Vu *et al.* (2016), la survie, la croissance et les réserves énergétiques et lipidiques de l'amphipode marin, *A. compressa* ont été affectées négativement par la Boscalid selon une réponse dose-dépendante. Des malformations antennaires ont été aussi observées sur les amphipodes à une concentration de 40 µg.L⁻¹. D'autres travaux de recherche portant sur un crustacé d'eau douce, *Daphnia magna*, ont permis de montrer les effets de la Boscalid sur les capacités de reproduction ainsi que des effets sur le stress oxydatif et la peroxydation lipidique (Aksakal, 2020).

Les herbicides (Nicosulfuron et Chlortoluron) ont induit des effets sur le comportement natatoire et la croissance de certains organismes aquatiques. Quant au fongicide (Boscalid), des effets importants ont été détectés sur le comportement de nage, sur le développement, le succès de reproduction, la croissance et les réserves énergétiques. Au vu de ces résultats et de l'inexistence de publications scientifiques sur *Crassostrea gigas*, il semblait pertinent de s'intéresser à ces molécules phytosanitaires, régulièrement retrouvées et détectées dans les Pertuis Charentais sur l'huître creuse.

D'autres pesticides ont été étudiés du fait de leur forte présence dans les écosystèmes marins et fluviaux. La présence d'herbicides, comme le Diuron, a été détectée dans de nombreux écosystèmes aquatiques du monde entier. Par exemple, en France, le Diuron a été identifié dans les eaux de surface

avec des concentrations allant de 0,05 à 20,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Léonard, 2002). Dans les baies et estuaires de l'Atlantique, des concentrations allant jusqu'à 0,7 et 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ont été observées (Munaron *et al.*, 2006). En raison de leur toxicité, certains herbicides sont interdits à la vente et à l'utilisation, comme le Diuron depuis 2008, et l'Atrazine (EEA, 2000). Effectivement des commissions et arrêtés nationaux et Européens sont mis en place afin d'instaurer ces interdictions d'usages.

Cependant, certains herbicides peuvent persister dans l'environnement même si leur utilisation a été interdite. Une étude récente a rapporté la présence de Diuron dans les milieux aquatiques français, confirmant sa persistance malgré les politiques de restriction (Pesce *et al.*, 2010). Régulièrement, des métabolites d'herbicides sont détectés dans les milieux aquatiques (Lanyi & Dinya, 2003 ; Sørensen *et al.*, 2003 ; Vargha *et al.*, 2005), comme pour le Diuron dans l'étude de Munaron *et al.* (2006).

2.3.2 Les effets écotoxicologiques sur les stades précoces de développement, chez l'huître creuse (*C. gigas*)

Comme mentionné précédemment, les premiers stades de vie d'une espèce semblent plus sensibles que les stades plus tardifs (Connor, 1972 ; Martin *et al.*, 1981 ; Quiniou *et al.*, 2005). Mais l'analyse bibliographique a mis en évidence un manque de données expérimentales sur les tous premiers stades de vie chez l'huître, c'est-à-dire la larve-D obtenue 24 h après fécondation (Gamain, 2016).

Le Lindane et l'Isoproturon testés à des concentrations allant jusqu'à 10 mg.L^{-1} pendant une période d'exposition de 9 jours ont montré des effets négatifs sur la survie et la croissance des larves d'huître creuse du Pacifique, *C. gigas* (Hiss & Seaman, 1993). L'Isoproturon s'est avéré présent à des concentrations plus faibles que le Diuron dans les milieux aquatiques (Munaron *et al.*, 2006). L'étude portée par Akcha *et al.* (2012) a montré des effets significatifs du Diuron sur le développement embryonnaire et larvaire à partir de la concentration la plus faible testée, de 0,05 $\mu\text{g.L}^{-1}$, soit une concentration écologiquement réaliste. Le Diuron peut donc avoir un impact significatif sur les taux de recrutement des huîtres en milieu naturel dans des zones potentiellement soumises aux pesticides.

Les pesticides peuvent être impliqués dans les événements de mortalité estivale des huîtres, pas nécessairement comme un seul agent causal, mais comme un facteur de stress supplémentaire parmi un cocktail de polluants. Dans une étude menée par Mottier *et al.* (2013), des anomalies de développement et arrêts de développement embryo-larvaires ont été observés après 48 h d'exposition au Roundup (solution commerciale à base de Glyphosate), à des concentrations fortes de 10 000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A des concentrations pertinentes pour l'environnement, l'étude de Mai *et al.* (2012), a montré, après 24 h d'exposition, des augmentations significatives du pourcentage de larves-D anormales et des cassures de brins d'ADN (dommages à l'ADN) à partir de 0,01 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour l'Irgarol et le S-Métolachlor. Dans la continuité de cette étude, Mai *et al.*, (2013) ont montré que la capacité fertilisante des spermatozoïdes était significativement affectée après une exposition de gamètes à des concentrations environnementales de pesticides (Irgarol, Diuron et Métolachlore). La progéniture obtenue à partir de spermatozoïdes exposés aux pesticides présentait une augmentation dose-dépendante d'anomalies de développement. De plus, une baisse significative du succès de la fécondation et une augmentation de la prévalence des larves-D anormales à 24 h, ont été observées à des concentrations de 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le S-Métolachlore et 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ d'Irgarol et 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le Diuron. En complément, le S-Métolachlore semble avoir des effets négatifs sur le développement larvaire chez l'huître creuse, lorsque les expositions sont associées à des facteurs confondants, tels qu'une baisse de température (Gamain *et al.*, 2016). Plus récemment, l'étude de Gamain *et al.* (2020), a montré l'effet du S-Métolachlore sur le comportement natatoire des larves-D, préalablement

exposées durant 24 h. Il a été observé des modifications du comportement de nage avec une augmentation des trajectoires de nage circulaires et une diminution des trajectoires de nage rectilignes (considéré comme un comportement normal), à des concentrations de 10 et 100 ng.L⁻¹.

La question des mélanges associant les pesticides avec d’autres familles de contaminants est régulièrement soulevée par les scientifiques. Les résultats de Mai *et al.* (2020) ont montré des effets liés à des mélanges de pesticides et de métaux sur les populations d'huîtres. Les résultats ont démontré que les mélanges de pesticides en combinaison avec ou sans Cuivre induisaient une augmentation dose-dépendante des effets embryotoxiques et génotoxiques sur les larves-D à partir de la plus faible dose testée de 108 µg.L⁻¹ (Cuivre associé aux pesticides).

Entre 2010 et 2020, plusieurs études se sont orientées sur les effets potentiels des pesticides (en mélange seul ou cocktail) sur les stades précoces de développement chez l’huître creuse (*C. gigas*). Des effets sur le développement, la croissance, la survie et le comportement de nage ont pu être mis en évidence. Cependant, un manque d’informations reste important sur certaines familles de pesticides.

2.3.3 *Processus de vectorisation des pesticides sur les plastiques*

Les substances pesticides sont présentes dans plusieurs types de produits (*e.g.* les produits phytopharmaceutiques, les produits biocides et les produits antiparasitaires). Cela représente plusieurs milliers de substances et plusieurs dizaines de milliers de produits de dégradation (Léonard, 2017), potentiellement dangereux pour l’environnement et les systèmes aquatiques (Adjagodo *et al.*, 2016). Lors de leur introduction dans le milieu, c’est-à-dire par dissolution dans l’eau de mer, certains pesticides peuvent subir un processus d’évaporation et se retrouver dans l’atmosphère.

Autre phénomène, les pesticides peuvent être adsorbés à la surface des microbilles de plastiques présentes dans l’eau de mer. En effet, le caractère hydrophobe de certains pesticides, comme le Chlortoluron, améliore la fixation de celui-ci sur les macroplastiques et/ou les MP. Le Chlortoluron peut alors être bioaccumulé par les organismes aquatiques (comme les bivalves) par filtration ou par ingestion des MP, à la surface desquels il est potentiellement adsorbé. Comme il a été dit plus haut, les contaminants chimiques tels que les pesticides auraient la capacité de se désorber des plastiques lorsque ceux-ci sont ingérés (Mato *et al.*, 2001 ; Teuten *et al.*, 2007). Une double toxicité serait donc alors intégrée par les organismes marins (Figure 28), tels que les bivalves : (1) la toxicité des polymères et des additifs plastiques ; (2) la toxicité des substances vectorisées, comme les pesticides.

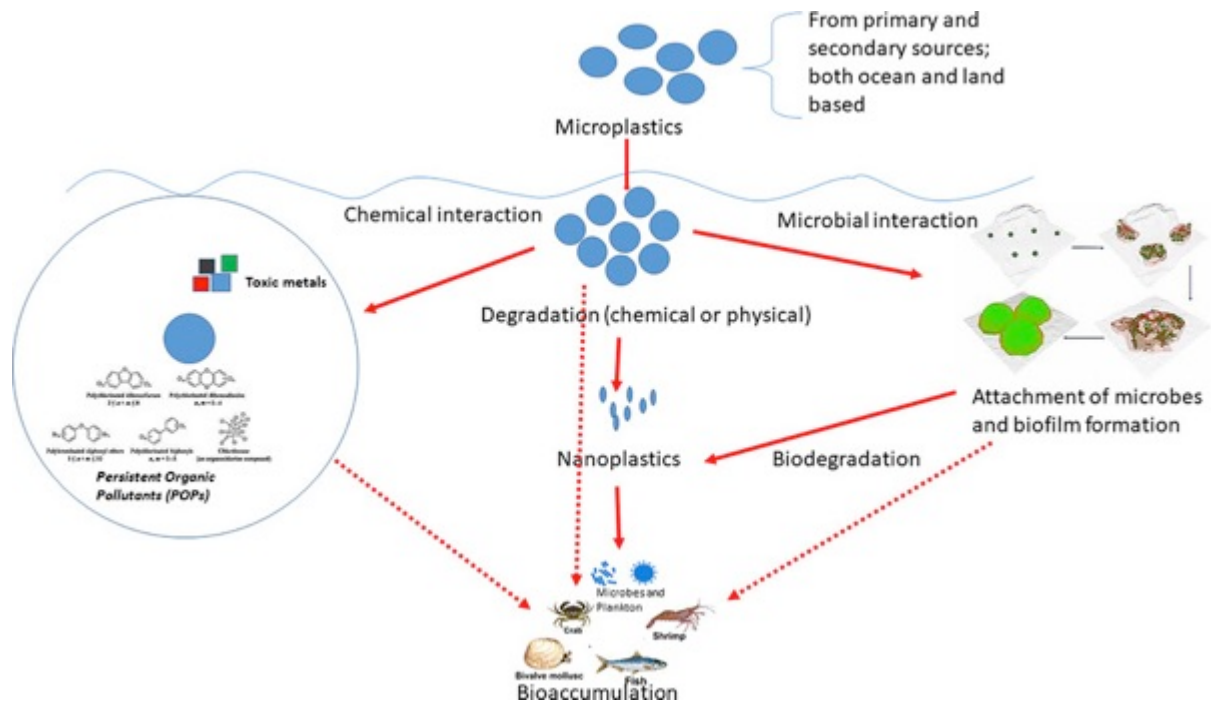


Figure 28. Interactions entre les MP et les pesticides (POP) pouvant amener une double toxicité chez les organismes bioaccumulateurs de MP. D’après les travaux de Mammo *et al.* (2020).

La bioaccumulation est le processus d’absorption de substances chimiques, présentes dans l’environnement, par des voies d’exposition telles que l’alimentation, l’absorption cutanée ou par les voies respiratoires (Mackay *et al.*, 2000), ainsi que leurs concentrations dans certains tissus des organismes. Chez les bivalves filtreurs, l’exposition aux contaminants se fait au cours des processus de filtration et d’ingestion des particules (Miramand *et al.*, 2003 ; Lacroix, 2014). Dans le cas d’une exposition à un mélange cocktail de pesticides (Carbaryl, Glyphosate, Métolachlore, Diuron, Atrazine), l’accumulation de ces composés chimiques peut dépasser les seuils toxiques dans les tissus, et engendrer des pathologies comme une vulnérabilité accrue face aux maladies infectieuses, en entraînant la diminution des défenses immunitaires des animaux (Gagnaire *et al.*, 2003) avec des conséquences à long terme pour les animaux mais aussi pour les consommateurs. La contamination par un cocktail complexe de plastiques et de pesticides peut altérer, entre autres, la croissance et la survie des organismes filtreurs, comme la moule (*Mytilus galloprovincialis* ; Pampanin *et al.*, 2005). Néanmoins, les produits phytosanitaires, ne sont pas les seules substances pouvant être vectorisées sur les plastiques dans l’environnement marin. Les POP rassemblent plusieurs catégories de polluants pouvant venir se fixer sur les polymères plastiques (Rodrigues *et al.*, 2018). Certains contaminants organiques sont associée aux plastiques durant leur fabrication industrielle (additifs chimiques) ou durant les rejets en milieux naturels (*e.g.* eaux usées, ruissellement urbain ou lixiviat d’enfouissement) ou au cours de leur vieillissement dans le milieu (Hartmann *et al.*, 2017). Dans une étude réalisée sur les côtes atlantiques portugaises, les familles prédominantes de POP trouvées sur les plastiques étaient les HAP (*e.g.* pyrène, fluoranthène, chrysène et phénanthrène) et les PCB (Frias *et al.*, 2010). Cependant, d’autres types de polluants comme les métaux (Ashton *et al.*, 2010 ; El Hadri *et al.*, 2020) et les pesticides (*e.g.* DDT ; Pannetier *et al.*, 2019) sont adsorbés et vectorisés par les plastiques, créant un mélange complexe de contaminants représentant une toxicité et un risque potentiels pour les écosystèmes marins.

CHAPITRE II – Démarches expérimentales & méthodologiques

A. La démarche expérimentale

B. Quelques outils méthodologiques

1. L'embryotoxicité

1.1. Le test d'embryo-toxicité sur les stades précoces de développement

1.2 Le comportement de nage

1.3 La culture phytoplanctonique

2. La valvométrie

*2.1 La mesure de l'activité valvaire chez l'huître creuse (*C. gigas*)*

2.2 L'analyse des données HFNI

3. Les systèmes expérimentaux pour le maintien en développement et expositions à différents stades de vie chez l'huître creuse (*C. gigas*)

A. La démarche expérimentale

Cette thèse s'est intéressée à l'étude, en conditions contrôlées de laboratoire, de différents stades de vie chez l'huître creuse, exposés aux polluants MP et pesticides. Les premières expérimentations se sont intéressées aux stades précoces de développement, potentiellement plus sensibles aux aléas de l'environnement et aux contaminations organiques. Pour ce faire, le test d'embryotoxicité sur les embryons d'huîtres creuses a été mis en place afin d'observer les potentiels effets de MP commerciaux, environnementaux et pesticides sur les larves-D. Dans la continuité, une expérimentation a été menée sur le stade pédivéligère, durant la phase de fixation au contact de MP environnementaux et un suivi à long terme a été opéré sur les premiers stades de grossissement naissains. Une analyse du comportement valvométrique, sur les huîtres juvéniles exposées durant 25 jours aux MP commerciaux de type HDPE et à l'herbicide Chlortoluron, a été effectuée en partenariat avec le Dr Damien Tran de l'UMR EPOC. De plus, une exposition a été réalisée sur les huîtres adultes, durant la période de gamétogénèse, afin d'observer les potentiels effets des MP environnementaux sur la génération larvaire parentale. La Figure 29, ci-dessous, récapitule le fil conducteur des expérimentations menées dans le cadre de cette thèse.

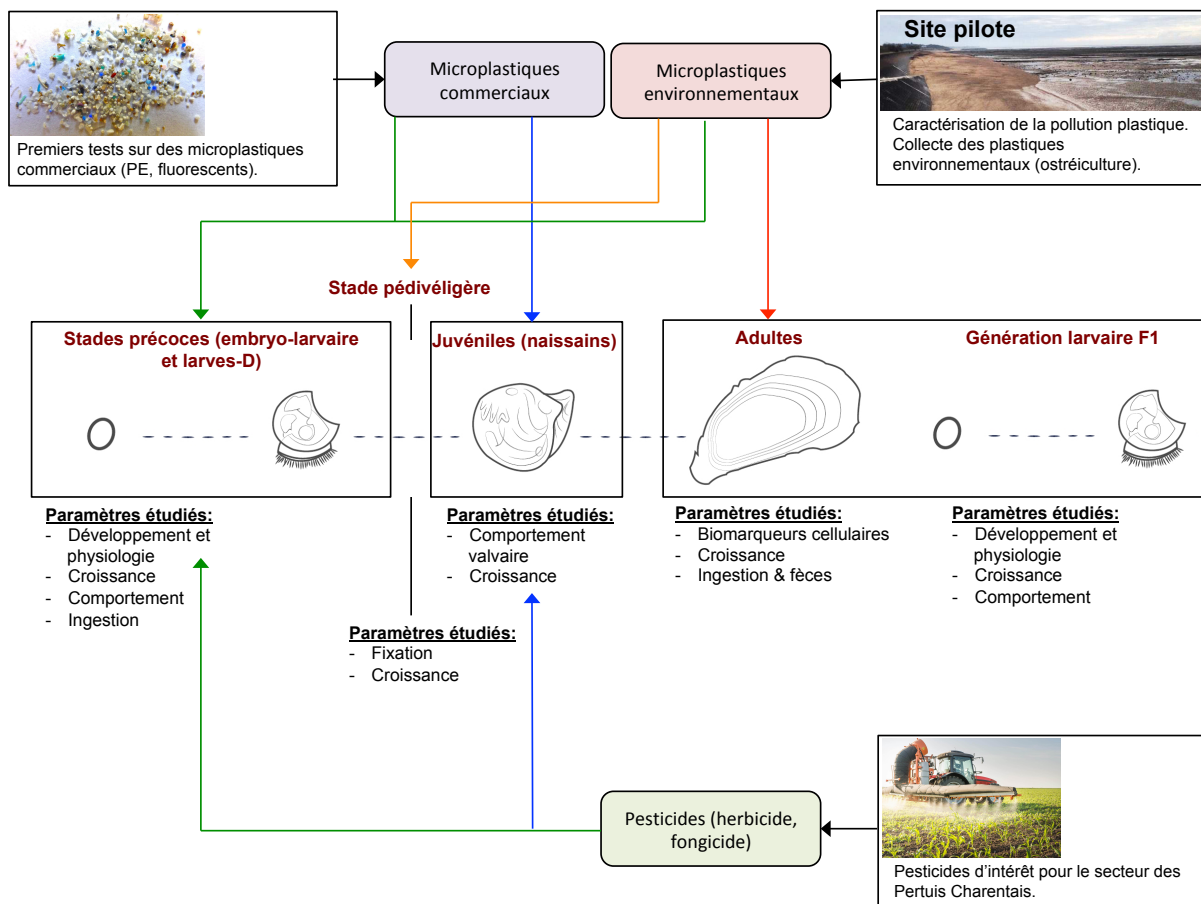


Figure 29. Schéma de synthèse des différentes expérimentations mises en place durant la thèse, sur trois stades de vie chez l'huître creuse (*C. gigas*) et différents polluants (MP et pesticides) représentatifs de la pollution des Pertuis Charentais.

Les objectifs sont d'apporter des connaissances et informations nouvelles aux professionnels de la filière conchylicole, dans le cadre du projet AQUAECOs, mais aussi d'accroître les connaissances générales sur les effets écotoxiques des pesticides et des MP.

B. Quelques outils méthodologiques

Un grand nombre de méthodes, protocoles et plans expérimentaux sont présentés dans les publications scientifiques rédigées, et présentées dans les Chapitres suivants. Pour compléter ces informations, quelques détails complémentaires ont été apportés sur le test embryo-larvaire et la démarche d'acquisition des données du comportement natatoire des larves-D ainsi que pour les systèmes de développement et culture phytoplanctonique pour la nutrition larvaire à 3 jours (72 h) et plus. Quelques informations complémentaires à l'Article 6 (*cf.* Chapitre V), sont apportées sur la technologie valvométrique. Pour finir, les dispositifs et systèmes expérimentaux, utilisés pour les expositions et le maintien des huîtres en développement, sont présentés.

1. L'embryotoxicité

1.1 Le test d'embryotoxicité sur les stades précoces de développement

Ces tests sont particulièrement utiles à des fins de surveillance de la toxicité en milieu marin, car ils nécessitent un temps d'exposition relativement court (24 h après fécondation) et sont sensibles. Ce test est basé sur le pourcentage de larves-D (normales) obtenues à la fin de l'embryogenèse (His *et al.*, 1997 ; Geffard *et al.*, 2002) et peut-être complété par des analyses comportementales et des suivis biométriques. L'eau de mer utilisée provient de la commune de la Flotte, située sur l'Île de Ré (Charente-Maritime). Afin de limiter toutes contaminations, l'eau de mer a été passée aux UV (ultraviolets) puis sur filtres de 50 ; 10 ; 5 ; 1 et 0,2 micromètres (μm ; Figure 30). Une oxygénation constante était maintenue dans l'eau nouvellement filtrée.

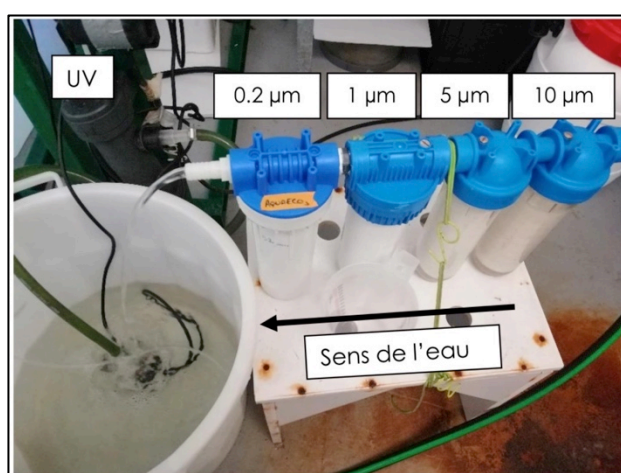


Figure 30. Système de filtration pour l'eau de mer. Photographie réalisée au cours des expérimentations (© Arno Bringer).

Les géniteurs mûres sont récupérés auprès de l'écloserie France Naissain (Bouin, Vendée, France). L'induction de la ponte est réalisée par un processus de stimulation thermique des géniteurs adultes

placés dans l'eau de mer filtrée. Les huîtres adultes sont placées alternativement pendant 30 minutes dans un bain d'eau froide (18 °C) puis dans un bain d'eau chaude (28 °C). Dès le début de l'émission de leurs gamètes, chacun des individus est isolé dans un petit volume d'eau de mer filtrée (bêchers de 250 mL) à la température du bain ayant fait pondre l'animal. Les solutions de spermatozoïdes ont ensuite été filtrées à 50 µm ainsi que celles des ovocytes à 100 µm afin d'éliminer les débris et les matières fécales (Gamain *et al.*, 2016). La mobilité des spermatozoïdes et la forme arrondie des ovocytes, utilisés comme indicateurs de la qualité des gamètes, ont été vérifiées par microscopie optique. Les solutions de spermatozoïdes et d'ovocytes ont été regroupées de manière à obtenir trois couples différents (triplicats). La quantité des solutions de gamètes a été déterminée pour un ratio de 1 ovocyte pour 10 spermatozoïdes. Le mélange a été agité manuellement toutes les 5 min, pendant 60 min. Le succès de la fécondation a ensuite été vérifié à la loupe binoculaire (grossissement x100), et les embryons ont été comptabilisés afin d'obtenir un volume de solution à prélever contenant environ 250 à 300 embryons pour chaque puits des microplaques. Trois réplicats techniques sont aussi mis en place. Les embryons préalablement comptabilisés, sont disposés dans des microplaques de 24 ou 12 puits en présence des solutions d'expositions (préparées en amont). Les microplaques sont alors placées dans une étuve thermostatée à 24 °C pendant 24 h. Par la suite, les microplaques sont considérées pour effectuer les différentes analyses.

1.2 Le comportement de nage

L'analyse du comportement natatoire des larves-D a nécessité la capture vidéo de chaque puit de chaque microplaque. Les vidéos, de 2 min, ont été converties au format AVI grâce au logiciel VirtualDub puis traitées avec le logiciel ImageJ selon le protocole de Gamain *et al.* (2020). La vidéo est premièrement convertie en échelle de gris puis en noir et blanc afin d'avoir un seuil entre ce qui est une larve et ce qui ne l'est pas. Un plugin permettant d'attribuer un numéro à chaque larve et de la suivre dans le temps est lancé (Gamain *et al.*, 2020). Le logiciel sort ensuite deux types de résultats, le premier est un diagramme reprenant les trajectoires de toutes les larves et le second se présente comme un tableur avec de nombreuses informations telles que la distance parcourue (pixel) le temps total de suivi (secondes), la vitesse moyenne et la vitesse maximale (en pixel par seconde).

Afin de calculer les vitesses maximales, le tableur présentant les données des vitesses maximales a été récupéré pour chaque vidéo. Il est important de savoir que ImageJ peut perdre certaines larves qui sortent du champ de vision, et que des particules peuvent être confondues avec les larves. Ainsi, pour obtenir la meilleure précision possible, les vidéos ont été comparées manuellement aux tableurs, afin de ne récupérer que les données pertinentes. Ces données de distance ont ensuite été converties en micromètre. Afin d'étudier les trajectoires de nage, le diagramme reprenant les trajectoires de chaque larve est utilisé. Les trajectoires ont été traitées avec une tablette graphique (Wacom Bamboo Pen&Touch) grâce au logiciel de retouche photo de Windows 10. Les trajectoires ont été divisées en 3 catégories : « rectiligne », « circulaire » et « surplace ».

Suite à la prise des vidéos pour l'analyse du comportement natatoire, les larves-D sont formolées dans les puits des microplaques. Une dose de 25 µL de formol (1 %) est injectée dans chaque puits. Par la suite, des photos sont réalisées pour étudier la croissance par la mesure de la longueur totale des larves-D de 24 h. Les microplaques sont conservées dans de l'aluminium et placées en chambre froide à 4 °C. Les malformations regroupant les anomalies de coquille (*i.e.* charnière concave et échancrure)

et anomalies de manteau (*i.e.* manteau rétracté et hypertrophie avec expulsion) ainsi que les arrêts de développement seront quantifiés pour finaliser le test embryo-larvaire.

1.3 La culture phytoplanctonique

Le phytoplancton est un organisme qualifié de planctonique car il se laisse dériver au grès des courants et ne dispose pas de capacité de mouvement propre (Hensen, 1887). Il constitue l'ensemble des cyanobactéries et microalgues présentes dans les océans. Les larves d'huîtres se nourrissent de phytoplancton durant leur croissance.

En conditions expérimentales, les larves sont nourries durant toute la phase larvaire à partir de 72 h avec les diatomées *Chaetoceros calcitran*, *Chaetoceros gracilis* (30 %) et la flagellée *T-isochrYSIS* (70 %). En effet, l'alimentation joue un rôle prépondérant dans la survie des larves. La taille des microalgues doit être compatible avec l'ouverture buccale des larves durant les différents stades larvaires. Au cours de la croissance la ration alimentaire quotidienne est augmentée. Afin de déterminer la quantité de nourriture à distribuer, il faut préalablement connaître la concentration des microalgues utilisées. Pour cela, nous nous sommes basés sur les données de la FAO (Helm *et al.*, 2006) en les adaptant à nos expérimentations.

Le principe de production du phytoplancton est basé sur la division cellulaire. Les microalgues sont cultivées directement au Marais expérimental CNRS. Au départ, les cultures s'effectuent dans des petits volumes, on parle de souches mères. Elles sont conservées dans des erlenmeyers de 3 L (Figure 31, à gauche) afin d'obtenir des concentrations élevées.



Figure 31. Culture de phytoplancton en conditions contrôlées, en erlenmeyer (à gauche) puis en colonne de culture (à droite). Photographies réalisées au cours des expérimentations (© Arno Bringer).

Au fur et à mesure, la concentration croît, et nous transférons la culture dans une colonne de 120 L (Figure 31, à droite). Pour permettre aux cellules de se multiplier correctement, nous augmentons le volume en ensemençant avec un milieu de culture adapté. L'ensemencement ou milieu de Conway se compose d'une solution principale mélangée à une solution de silice et des vitamines. La silice est indispensable pour le développement cellulaire des diatomées (Helm *et al.*, 2006). Le repiquage du phytoplancton permet d'augmenter le volume de la culture en rajoutant de l'eau enrichie en nutriments. Pour 1 L d'eau de mer (salinité entre 28 et 34), on ajoute 1 mL de chaque solution d'ensemencement. Afin d'optimiser la qualité de la culture, l'ensemencement s'effectue avec de l'eau filtrée à 1 μm . Une filtration fine et l'utilisation de filtres UV permettent de limiter les pathogènes

dans l'élevage (Helm *et al.*, 2006). Le milieu de culture doit être stérile afin de ne pas favoriser le développement de parasites ou de prédateurs. Les colonnes et erlenmeyers sont nettoyés plusieurs fois par semaine et le phytoplancton est filtré dans un tamis de 80 µm afin de retirer les plus grosses particules et les amas de phytoplancton morts. Enfin les cultures disposent d'un bullage en continu et sont soumises à un éclairage UVB 24/24 h et 7/7 j.

Le phytoplancton produit a notamment été utilisé pour l'alimentation des larves d'huitres creuses âgées de 72 h et pour les stades de vie plus âgés (*i.e.* larves pédivéligères).

2. La valvométrie

Durant l'expérimentation menée sur des huîtres naissains, issues d'écloserie (France Naissain), des électrodes ont été installés sur les deux valves des huîtres (Figure 32) afin d'enregistrer l'activité valvaire durant une période de 31 jours (7 jours d'acclimatation + 24 jours d'exposition). Ce système est donc constitué de deux électrodes collées sur chaque valve de l'animal entre lesquelles existe un champ électromagnétique. Les valeurs de courant associées permettent la mesure des paramètres suivants : croissance de l'animal (mm), amplitude d'ouverture (VOA, en % d'ouverture), durée d'ouverture (VOD, en % de temps ouvert), et nombre de microfermetures. Ces paramètres sont mesurés en continu toutes les 1,6 secondes pour chaque individu, permettant l'obtention d'un très grand nombre de données horaires et journalières, enregistrées sur des disques durs, en attente du traitement de données.



Figure 32. Huître équipée d'électrodes reliées au valvomètre pour l'acquisition des données de comportement valvaire. D'après les travaux de Tran *et al.* (2003).

2.1 La mesure de l'activité valvaire chez l'huître creuse (*C. gigas*)

Au cours de l'expérimentation, l'activité valvaire des huîtres a été enregistrée continuellement au cours du temps grâce à un dispositif haute fréquence non invasif de valvométrie (dispositif HFNI) couplé à des systèmes d'électrodes, élaboré par le laboratoire EPOC de Bordeaux (Tran *et al.* 2003). Les huîtres ont été, en effet, équipées d'une paire d'électrodes électromagnétiques chacune, incluses dans de la résine et collées face à face sur chacune des valves. Les électrodes, légères, ont été connectées au système d'acquisition *via* des fils de cuivre libres, afin de ne pas contraindre les mouvements des valves. Le fonctionnement du dispositif consiste à mesurer à haute fréquence (toutes

les 4,8 secondes) la tension exercée dans les fils de cuivre qui varie en fonction de la proximité des électrodes l'une de l'autre, et donc de l'ouverture des valves. Les données ainsi acquises pendant les phases d'acclimatation et d'exposition ont été traitées par le logiciel LabView 8.6 (™National Instruments, Austin, TX, USA).

2.2 Les analyses des données HFNI

L'analyse du comportement valvaire a été réalisée selon trois paramètres complémentaires mesurés pour chacune des huîtres. En premier lieu, l'amplitude d'ouverture valvaire (VOA), pour laquelle un score de 100 % représentait une ouverture maximum pendant le temps d'acquisition des données (par heure ou jour). En second lieu, la durée d'ouverture valvaire (VOD) a été mesurée, pour laquelle un score de 100 % indique que les valves de l'huître ont été ouvertes pendant toute la durée d'acquisition des données (par heure ou jour). Enfin, les micro-fermetures (VMC) ont été mesurées. Le nombre de micro-fermetures mesurées pendant le temps d'ouverture des valves correspond à une réponse à un stress ressenti par l'huître (Tran *et al.*, 2010). Des mesures de croissance ont pu être effectuées grâce au dispositif HFNI couplé au système d'électrodes. En effet, puisque le processus de calcification des coquilles des huîtres se fait au niveau de sa surface interne, la mesure de la distance minimale entre les deux électrodes d'une même huître, lorsque les valves sont fermées (caractérisé par une VOA de 0 %), représente un outil de mesure de la croissance des coquilles.

3. Les systèmes expérimentaux pour le maintien en développement et expositions à différents stades de vie chez l'huître creuse (*C. gigas*)

Plusieurs dispositifs et systèmes expérimentaux ont été mis en place dans le cadre de cette étude de thèse. Les expositions en conditions contrôlées de laboratoire, à différents stades de vie chez l'huître creuse (*C. gigas*) ont amené à utiliser des structures et outils différents (Figure 33). Le temps d'exposition est un facteur important à prendre en compte lors de la mise en place d'outils adaptés. Lors du test d'embryotoxicité, les embryons ont été exposés directement dans des microplaques 24 puits (analyses des larves-D à 24 h) et 12 puits (analyses des larves-D à 72 h). Par la suite, les analyses ont été réalisées grâce au microscope Zeiss Axio Z1, équipé d'un caisson thermostaté permettant de maintenir une température optimale pour les larves-D durant les analyses. Notre étude sur les larves pédivéligères (âgées de 17 jours) a permis de développer des dispositifs expérimentaux adaptés et novateurs afin de réaliser l'expérimentation. Les larves pédivéligères ont tout d'abord été placées dans des microcosmes pour la fixation. Les microcosmes se constituaient d'un grand bac de 224 L, contenant des tamis (triplicats pour chaque condition) remplis de microbrissures placés sur une table en inox. Ces tamis étaient tous reliés à un système d'air-lift (upwelling) afin de renouveler l'eau en continu sans empêcher les larves de venir se fixer au fond des tamis. Par la suite, les larves fixées ont été placées en micronurserie pour le développement précoce de la coquille, puis en nurserie extérieure pour poursuivre le développement des jeunes stades naissains. Pour ce qui est des expositions à plus long terme sur les stades naissains (âgés de 12 mois et exposés 24 jours) et adultes (âgés de 24 mois et exposés 2 mois), une batterie d'aquariums (triplicats pour chaque condition) était mise en place et reliée à un bac tampon afin d'avoir un renouvellement d'eau continu et en circuit fermé. Les systèmes de microcosmes et aquariums étaient équipés d'un contrôleur de température, un filtre à ultra-violet, d'un brasseur à courant ainsi que d'un système d'oxygénation de l'eau.

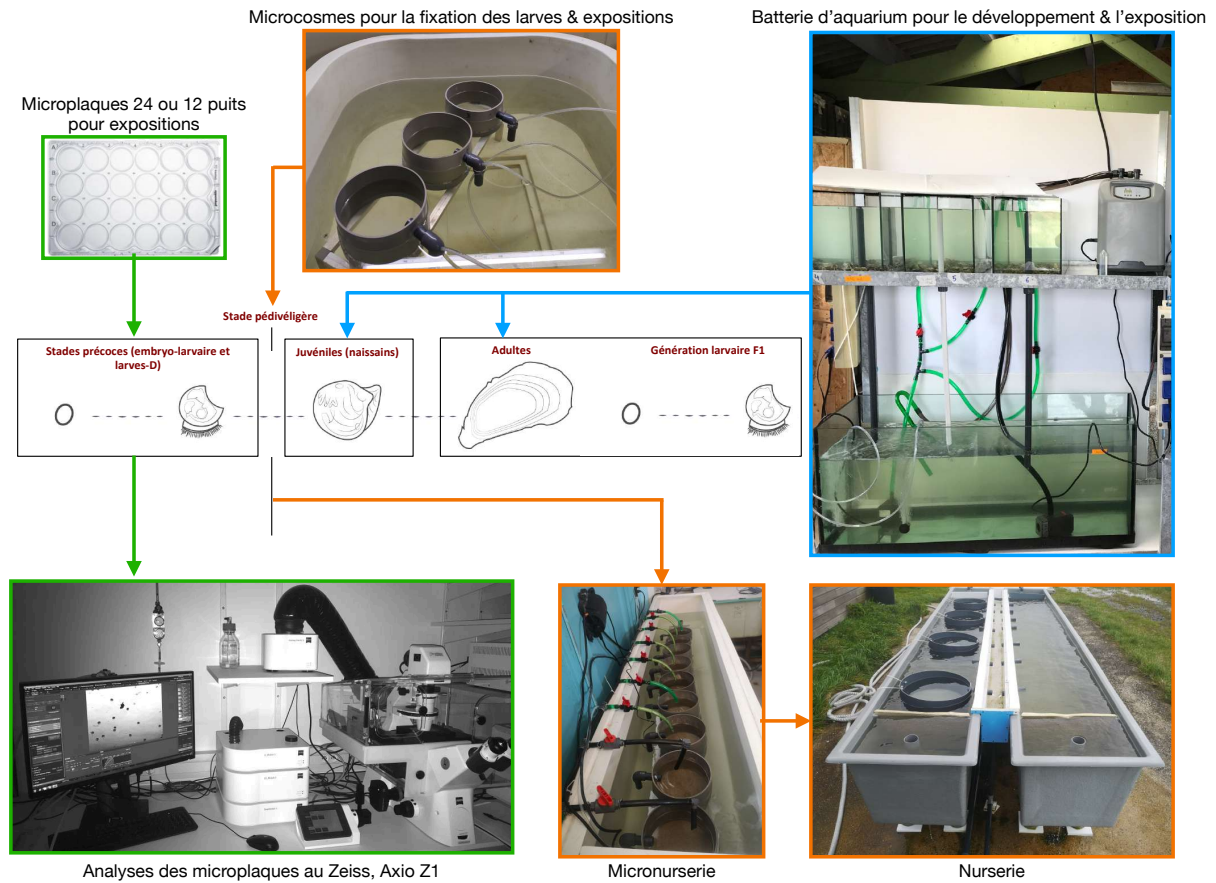


Figure 33. Représentation des dispositifs et systèmes pour le maintien en développement et l'exposition à différents stades de vie chez l'huître creuse (*C. gigas*). Photographies réalisées au cours des expérimentations (© Arno Bringer).

**CHAPITRE III - Évaluation &
caractérisation de la pollution plastiques
(macro/micro) sur un site d'étude pilote
des Pertuis Charentais**

Préambule

A. Article 1 : État des lieux de la contamination plastique et identification d'additifs de phtalates sur les plastiques ostréicoles, sur un site pilote des Pertuis Charentais

Préambule

Ce chapitre vise à mieux caractériser et identifier la pollution plastique sur un site d'étude pilote des Pertuis Charentais. Pour ce faire, le littoral d'Angoulins-sur-mer (Charente-Maritime, France) a été identifié comme un site pertinent. De par sa proximité avec certaines concessions ostréicoles et du fait de la configuration et l'hydrodynamisme observé dans ces écosystèmes, de grandes quantités de plastiques ont été observées sur cette zone littorale. Plusieurs actions ont été mises en place afin de mieux caractériser cette zone littorale en termes de contamination macro et microplastiques :

- (i) collecte, identification et recensement des macroplastiques présents en suivant le protocole de suivi OSPAR (OSPAR Commission, 2010) sur une bande de plage littorale de 100 m. Le focus a ensuite été mis sur les plastiques d'origine ostréicoles.
- (ii) identification des polymères principaux constituant les plastiques ostréicoles collectés, par analyse pyrolyse GC-MS (partenariat avec le Cedre de Brest).
- (iii) prélèvements sédimentaires sableux (de surface et sur 5 cm de profondeur) sur le littoral d'Angoulins-sur-mer et récupération des MP présents par protocole MPSS (Microplastic Sediment Separator ; MSFD Technichal Subgroup on Marine Litter, 2013 ; partenariat avec le CEDRE de Brest).
- (iv) identification et quantification des MP dans le compartiment sableux par analyse LDIR (partenariat avec Agilent Technologies, Allemagne).
- (v) identification et quantification des polluants et additifs additionnels présents sur les plastiques d'origine ostréicoles, ayant vieillis en mer : phtalates, hydrocarbures (HAP) et PCB (partenariat avec le Cedre de Brest).

Identifier et caractériser la contamination plastique (macro/micro) sur un site d'étude littoral pilote des Pertuis Charentais, avec un focus sur les plastiques utilisés en ostréiculture.

Cette présente étude a été publiée, en Mars 2021, sous la forme d'un article scientifique dans *Marine Pollution Bulletin*. Des analyses complémentaires, non présentées dans cet article, ont été apportées via le volet environnemental du projet AQUAECOs (Lerebours, 2021), et sont décrites en Annexe 2.

A. Article 1 : État des lieux de la contamination plastique et identification d'additifs de phtalates sur les plastiques ostréicoles, sur un site pilote des Pertuis Charentais

A travers cet article, un état des lieux préliminaire de la contamination plastique a été réalisé en début de projet, sur un site d'étude pilote des Pertuis Charentais. Le site d'Angoulins-sur-mer, proche de La Rochelle, a donc été sélectionné. Dépourvus d'actions de ramassages et collectes participatives des macrodéchets plastiques, ce site était donc intéressant pour déterminer le niveau de pollution plastique. De plus, ce site est exposé aux activités ostréicoles actuelles ainsi qu'aux friches de production abandonnées et non-nettoyées. Pour ce faire, une campagne de collecte des macroplastiques, a été réalisée en 2018 (Septembre à Décembre). Le protocole OSPAR a été mis en place avec des collectes réalisées sur une bande littorale de 100 m. Par la suite, des échantillonnages dans le sédiment de surface et sur 5 cm de profondeur ont été effectués sur ce même littoral. L'objectif était ensuite de récupérer les MP présents dans le sédiment grâce au MPSS (Microplastics Separator in Sediments) par différence de densité des solutions et des éléments présents. Les MP récupérés ont ensuite été placés sur filtres et envoyé au laboratoire d'Agilent (Allemagne) afin d'être caractériser et quantifier par LDIR automatisé. En suivant, nous avons établi un focus sur les plastiques ostréicoles : couplelle de captage, tube de captage et poche ostréicole. En partenariat avec le laboratoire du Cedre de Brest, des analyses en pyrolyse GC-MS nous ont permis de confirmer les polymères principaux de ces 3 différents plastiques ostréicoles. Ensuite, une pyrolyse en désorption a permis d'identifier les additifs de phtalates et HAP présents en surface de ces plastiques. Les premiers résultats montrent la présence de macroplastiques en grande quantité, dont 70 % sont relatifs aux outils aquacoles. Dans le sédiment, les MP les plus représentés sont des fibres de polyamide, d'une taille de 10-20 μm . La concentration retrouvée sur ce site était comprise entre 397 et 457 MP.kg⁻¹. En mettant le focus sur les plastiques ostréicoles, nous avons démontré que les tubes de captage en PVC contenaient le plus d'additifs et de POP avec notamment du diméthylphtalate et du naphthalène (HAP) en plus grande concentration que dans les autres plastiques.

Cette première étude nous a permis d'effectuer un premier état des lieux sur un site potentiellement impacté par l'activité conchylicole. De plus, la caractérisation des plastiques ostréicoles vieillis dans l'environnement et qui seront utilisés dans les expérimentations contrôlées en laboratoire, sera complétée par des travaux en cours et futurs.

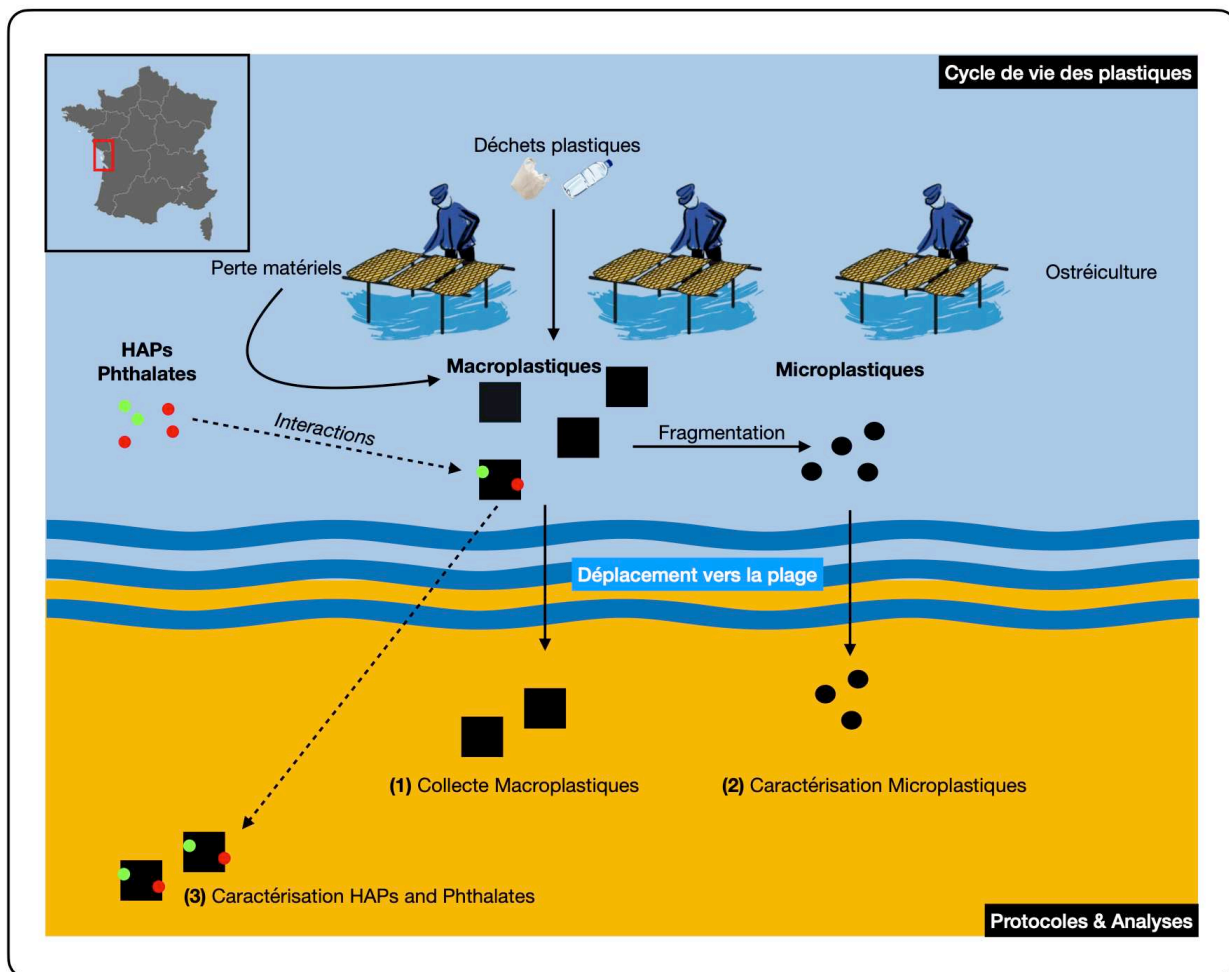


Figure 34. Schéma résumant les travaux réalisés dans le cadre de l'Article 1.



Contents lists available at ScienceDirect

Marine Pollution Bulletin

journal homepage: www.elsevier.com/locate/marpolbul



Coastal ecosystem inventory with characterization and identification of plastic contamination and additives from aquaculture materials

Arno Bringer^{a,*}, Stéphane Le Floch^b, Andreas Kerstan^c, Hélène Thomas^a

^a Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

^b Cedre, 715 rue Alain Colas, 29218 Brest Cedex 2, France

^c Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:
Microplastics
Sediments
Additives
Aquaculture
Atlantic beach

ABSTRACT

In the early 1970s, studies of marine litter first appeared in the scientific literature. Fifty years later, knowledge of several coastal areas of the Atlantic, the driving forces of oyster farmers and aquaculture, is lacking. This work documents a pilot study on an Atlantic coastal area (France). This study aims to (i) characterize the abundance of macroplastics related to aquaculture tools; (ii) microplastics present in beach sediments and (iii) characterization of pollutants present on aquaculture plastics collected. First, it was observed that 70% of the plastics collected on the beach were characteristic of aquaculture materials. In sediments, MPs most found were Polyamide between 10 and 20 μm , with a total MP concentration of 397–457 MPs.kg^{-1} . Pipes collectors (PVC), frequently used in aquaculture, have been shown to have concentrations of dimethylphthalates and naphthalene. Waste management and support policies can then base their actions on such studies, in order to improve their knowledge.

1. Introduction

From the 1970s, environmental contamination by plastic debris was documented in marine environments. Nowadays, the dispersion of plastic in aquatic environments highlights a global distribution, especially in highly industrialized areas (Baalkhuyur et al., 2020) or with important economic activities such as aquaculture, fishing or shellfish farming (Jang et al., 2020). In 2019, global production of plastics reached almost 368 million tons while European production almost reached 57.9 million tons (Plastics Europe, 2020). In the plastics industry, the three most common polymers are: polyethylene (PE) with 29.7%, polypropylene (PP) with 19.3% and PVC with 10% (Plastics Europe, 2019). The destination of anthropogenic land or marine pollutants, in particular plastics, is the marine environment (Halpern et al., 2008). To avoid a massive build-up of plastic in the environment, coordinated global action is urgently needed to reduce plastic consumption; increase rates of reuse, waste collection, and recycling (Lau et al., 2020). Jambeck et al. (2015) estimated that between 2 and 5% of these plastics are released into the oceans. Macroplastics are regularly found in marine environments, on coasts and beaches (Lee et al., 2013; Maharana et al., 2020; Ryan et al., 2020). Their non-degradation over time is a major problem and leads to their fragmentation into smaller

fragments of plastics: microplastics (MPs), such as plastic bottles, bags and packaging (Cole et al., 2011; Rocha-Santos and Duarte, 2015; Wright et al., 2013). This fragmentation can be caused by chemical and physical aging, as well as biological degradation (Paço et al., 2017). MPs are defined as plastic particles, of any shape, ranging from 1 μm to 5 mm in size (Cole et al., 2011; Wagner et al., 2014). Nanoplastics are plastic particles whose length is less than 100 nm (Lambert and Wagner, 2016; Gigault et al., 2016). The rates of MP accumulation in the marine environment have increased dramatically with the expansion of plastic products (Rodrigues et al., 2018; Serranti et al., 2018). MPs can be found in all components of the ecosystem (Cai et al., 2017). Many recent studies have detailed the significant increase in the amount of these particles in the oceans. Studies have reported a large amount of microplastics in sediment (e.g. Claessens et al., 2011; Lots et al., 2017; Hengstmann et al., 2018). Phthalates are synthetic chemicals commonly used in many consumer products because they increase the flexibility and durability of plastic (Ülker and Ulker, 2019). MPs can also be loaded with persistent organic pollutants (POPs) and, therefore, loaded with Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and phthalate additives, by vectorization (Caruso, 2019). The vectorization phenomenon could also lead plastics to adsorb on their surface all other types of pollutants such as PCB, pesticides, metals or pharmaceutical residues (Provencher et al.,

* Corresponding author.

E-mail address: arno.bringer1@univ-lr.fr (A. Bringer).

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112286>

Received 10 December 2020; Received in revised form 11 February 2021; Accepted 12 March 2021

0025-326X/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

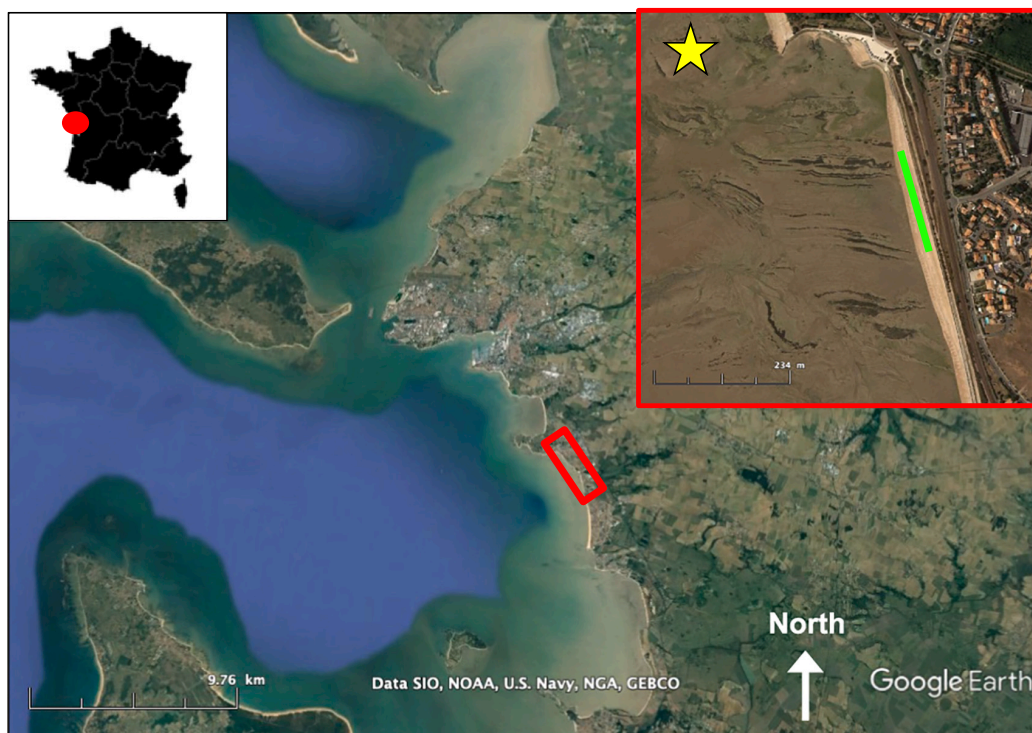


Fig. 1. Google Earth map: the sampling site of Angoulins-sur-Mer, in Pertuis Charentais (South-West, France) is indicated within the red rectangle. A zoom on the sampling site is visible in the top left with the presence of an oyster farm (yellow star) and the 100 m strip of samples (green line). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

2018; Hodson et al., 2017; León et al., 2019). This mode of action could lead to double plastic toxicity and further harm the marine environment. There is an urgent need for innovative studies to confirm or demystify the eminent danger of adsorbed MPs and POPs, as well as their true role in marine environments. The consequences are important for the environment and biota (Browne et al., 2008; Cole et al., 2013; do Sul and Costa, 2014), including for commercial species such as oysters, *Crassostrea gigas* (Avio et al., 2015; Neves et al., 2015; Bringer et al., 2020). Phuong et al. (2018) showed that MPs contamination of bivalves can vary according to season, species and wild or cultivated character of the individuals. Sussarellu et al. (2016) demonstrated that the ingestion of polystyrene (PS)-MPs causes an alteration of energy flows, metabolism, and homeostasis in oysters, resulting in a loss of energy dedicated to the reproductive function. Taliec et al. (2018) worked on the effects of PS-NPs on the larval stages of *C. gigas* and observed a significant increase in the number of malformations and developmental arrest (early mortality) in larvae exposed to NPs. The trophic chain could potentially lead to notorious effects on human health related to the ingestion of MPs (Van Cauwenberghe and Janssen, 2014; Rochman et al., 2015). Microplastics can harm humans through physical and chemical ways (Smith et al., 2018). However, very few studies have been able to diagnose the effects of MPs on humans. Evidence indicates a complex toxicology of plastic on marine life (Worm et al., 2017) and the transfer to the food chain and to human. Further researches are necessary to evaluate to which degree plastics can transport pollutants to humans via seafood. MPs found in the environment are likely to increase the transport and bioavailability of other persistent organic pollutants (POPs), which are bioaccumulate and toxic (Gouin et al., 2011). This could lead to double plastic toxicity and further harm the marine environment. Regarding phthalates, they have an acute toxicity, in particular on human health, described as an endocrine disruptor (Net et al., 2015) and Godswill and Godspel, 2019). However, their toxicity depends on their structure (US EPA, 2012). In addition, several studies (Van et al., 2012; Fisner et al.,

2013a) have demonstrated the contact of PAHs with plastics, potentially vectoring a persistent organic pollutant on plastics (Mato et al., 2001; Moore, 2008; Caruso, 2019; Turra et al., 2014). PAHs are toxic substances for both human health and the environment (Lundstedt et al., 2007). This includes bivalve organisms in contact with these substances (Law et al., 2002). The use of plastic can have several origins, food consumption, water pipes, textile fibers, cosmetics, etc. (Enfrin et al., 2019; Welden and Lusher, 2020). Aquaculture is an important economic sector on the French Atlantic coast and in particular in the Pertuis Charentais sector (Mazeaud et al., submitted). Professional tools on aquaculture farms can be lost during handling and end up in the water column before they run aground on beaches (Andrady, 2017). Mariculture/aquaculture activities are potentially important sources of MPs contamination (Chen et al., 2018). MPs from fishing activities have been observed in marine seawater and sediments at surface and depth (Manalu et al., 2017; Xue et al., 2020). There is an urgent need for innovative studies to confirm or demystify the eminent danger of adsorbed MPs and POPs, as well as their true role in marine environments. The present study was considered as the first step to achieve this objective, in a pilot area of Pertuis Charentais. To do this, several analyzes were set up: (i) characterization of the abundance of macroplastics on the study range, with a focus on aquaculture plastics; (ii) identification and characterization of MPs in beach sediments (sizes, polymers, concentrations), (ii) characterization and identification of PAHs and phthalates adsorbed on the surface of the main frequently used aquaculture plastics.

2. Materials and methods

2.1. Study area and sampling

The study focused on a pilot area in Pertuis Charentais (South-West, France), more precisely in the Angoulins-sur-Mer municipality (Fig. 1).

CHAPITRE III – Évaluation & caractérisation de la pollution aux microplastiques sur un site d'étude pilote des Pertuis Charentais

A. Bringer et al.

Marine Pollution Bulletin 167 (2021) 112286

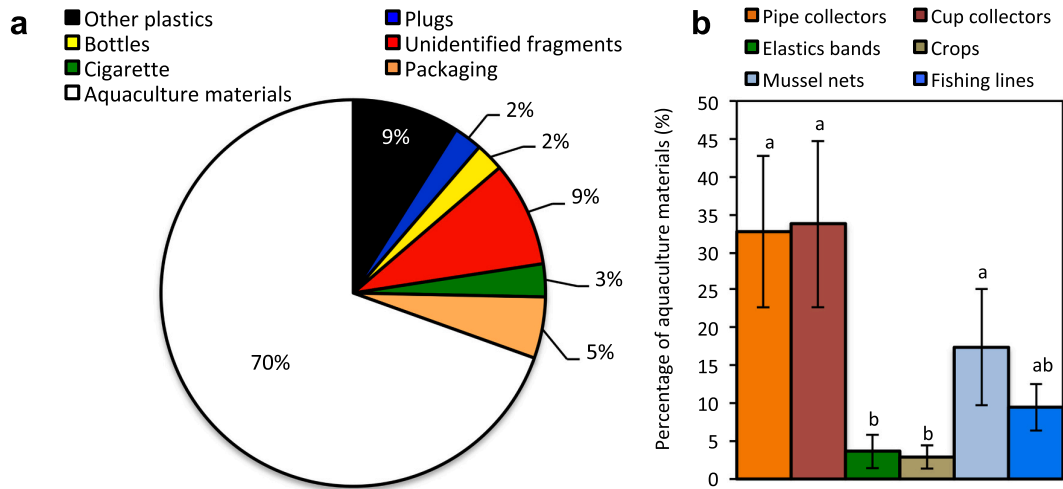


Fig. 2. (a) Percentages based on a four-month investigation, classifying the total number of plastic items collected into different categories. (b) Focus on plastic subcategories pertaining to aquaculture materials. Different letters indicated significant differences between different concentrations ($p < 0.05$, ANOVA and Tukey test). Values are mean \pm SEM for three replicates.

The collections and sampling were carried out on a beach there. The sandy zone was selected because of its exposure and proximity to shellfish activity. In addition, it fulfilled all the criteria of a reference beach, being accessible, longer than 1 km and not subject to pick-up operations at the time of our experiment.

Marine litter affects marine life at different organizational levels and its impact varies according to target species or populations, source activities, environmental conditions and region or country (Gerigny et al., 2018). In the definition of Good Environmental Status, submitted by the Marine Strategy Framework Directive (MSFD), indicators have been put

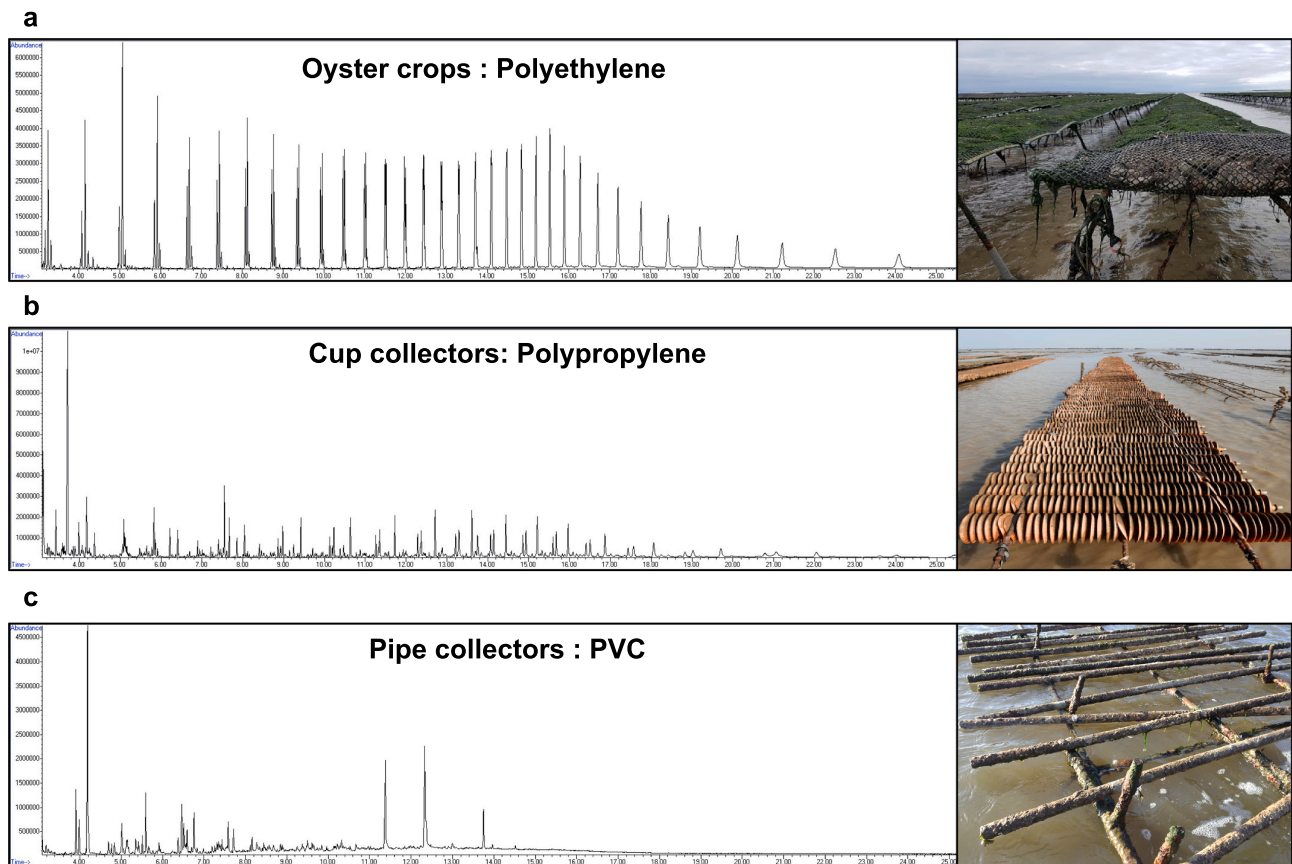


Fig. 3. Pyrolysis GC-MS analysis for (a) polyethylene plastic crops, (b) polypropylene plastic cup collectors and (c) PVC pipe collectors representing the main materials used in oyster farming.

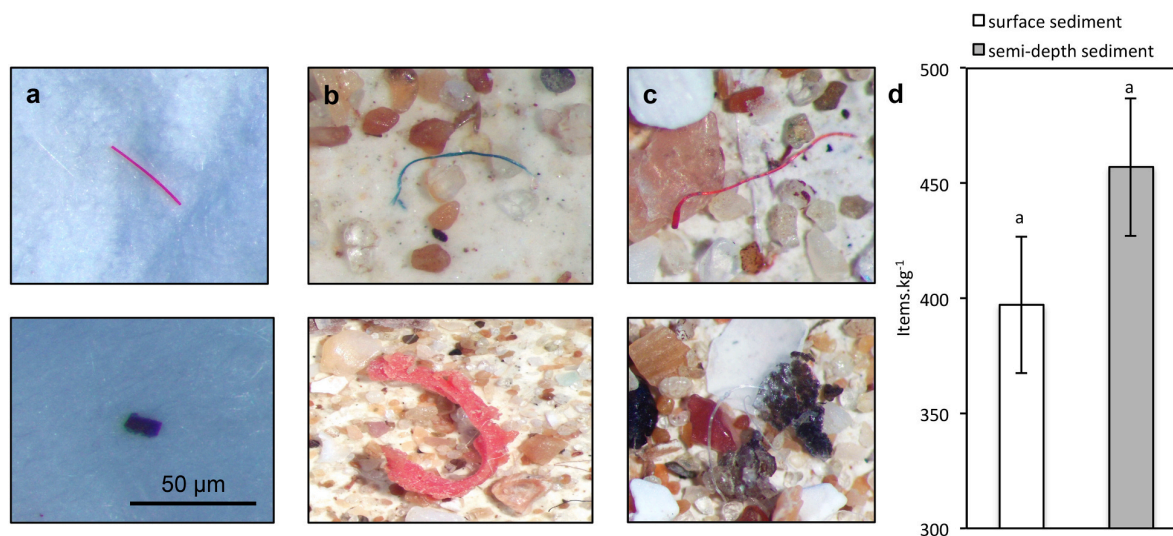


Fig. 4. Pictures of microplastics (Leica Binocular, x20) analyzed using a 0.2 μm -filter for the different conditions: (a) control (external contamination), (b) surface sediments and (c) semi-depth sediments (5 cm) samples. Scale bar represents 50 μm . And (d) histograms represent quantification/concentration of MPs found for surface and semi-depth sediment. Different letters indicated significant differences between different concentrations ($p < 0.05$, ANOVA and Tukey test). Values are mean \pm SEM for three replicates.

in place. These indicators are based on the recommendations of the MSFD Technical Group on Marine Litter (TG-ML) and concern (i) beach (macroplastic) litter; (ii) MPs in sediments and at the surface and are defined as “pressure” criteria (MSFD Technical Subgroup on Marine Litter, 2013).

2.2. Data macroplastic collection

The plastic macro-waste collections were carried out following the protocol implemented by OSPAR (Monitoring Marine Litter on the Beaches in the OSPAR Maritime Area, OSPAR Commission, 2010). Between September 2018 and December 2018, four collections were made (once a month) on the beach (Fig. 1). A 100 m strip was randomly selected and remained the same for the 4 collections. Waste larger than 5 cm were taken and stored. The collection conditions were the following: temperatures between 12 and 21 $^{\circ}\text{C}$, humidity rates of 40–70%, westerly winds between 10 and 40 km/h, and low tide. Using the methodological guide provided in the OSPAR protocol (OSPAR Commission, 2010), we carried out a weighing and sorting of macro-waste. A special attention has been given to oyster farm materials and more generally on aquaculture materials.

2.3. Sediment collection and microplastics characterization

As part of the MSFD (Marine Strategy Framework Directive) monitoring program (MSFD Technical Subgroup on Marine Litter, 2013), the collection of microplastics on the coast followed a very specific protocol. In order to harmonize the monitoring of marine litter (macro and micro) in various marine compartments in European Union (Directive, 2013), a group of European experts (MSFD Technical Subgroup on Marine Litter or MSFD/TSG-ML) was set up. The TSG-ML (Galgani et al., 2013) issued a number of protocol guidelines and recommendations, including some on assessing and monitoring contamination by microparticles (mainly microplastics). The samples were collected on the 100-meter portion of the beach where macro-waste was taken ($n = 3$ replicates). A fixed point was determined at the high tide mark with an approximate coefficient of 80 for the macro-tidal system. On the selected area, four samples were collected every 25 m to replicate samples for both surface and semi-depth sediments (5 cm deep). A 5 mm mesh was used to remove the largest debris. The four portions of harvested sediments were

homogenized to obtain one sample, which was stored at -20°C .

Then, excretion by MPSS (Microplastics Separator in Sediments) was carried out using a solution of CaCl_2 (density = 1.38). This system brought the MPs that had a lower density than the sandy particles up, such as silica. The tools used were cleaned and rinsed with a 0.2 μm filter. After recovering the MP samples, the solution was first put on a 0.2 μm filter and then in a petri dish. The filters were dried in an oven at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h. The observations and photos were taken using binocular (Leica, x20). To characterize the sizes and polymers observed, an analysis was carried out using the Agilent 8700 LDIR system (Agilent Technologies). The LDIR 8700 combines the latest Quantum Cascade Laser (QCL) technology with fast scanning optics to quickly deliver clear high-quality spectral data and images. Several key steps have been put in place to avoid any external contamination. All the material used was cleaned several times with filtered 70% ethanol (0.2 μm) and filtered Milli-Q water (0.2 μm). To assess the external contamination, a blank was performed without adding sediments ($n = 3$ replicates).

2.4. Chemical characterization of oyster farm materials

To identify the main polymers in oyster farms materials collected from our study area, a GC-MS pyrolysis analysis was carried out using cup collectors, pipes collector and an oyster crops. It enabled to quantify potential PAHs and phthalates present on aged plastics collected.

2.4.1. Identification of polymers

The analytical procedure published by Fries et al. (2013) was followed. Five hundred μg of polymer was precisely weighed and transferred to a pyrolysis vial. A GC-MS analysis was performed using a gas chromatograph (Agilent 7890N) equipped with a Combipal MPSS2 multifunctional injection system (Gerstel, Switzerland) on ‘splitless’ mode and a pyrolyzer (Gerstel Pyro). The cooling injection system (CIS) was programmed from 50 $^{\circ}\text{C}$ (0.3 min) to 350 $^{\circ}\text{C}$ (2 min) at 12 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$. The sample was then pyrolyzed at 700 $^{\circ}\text{C}$ for 60 s. During the desorption phase, the interface temperature was maintained at 350 $^{\circ}\text{C}$. The oven temperature program was set from 50 $^{\circ}\text{C}$ (2 min) to 320 $^{\circ}\text{C}$ (10 min) at 20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. The helium carrier gas was at a constant rate of 1.2 mL $\cdot\text{min}^{-1}$. The capillary column was an HP-5-MS (Agilent Technologies): 30 m \times 0.25 mm ID \times 0.25 μm (film thickness). The chromatograph was coupled to a 5975N mass spectrometry detector. Pyrolysis-mass spectra

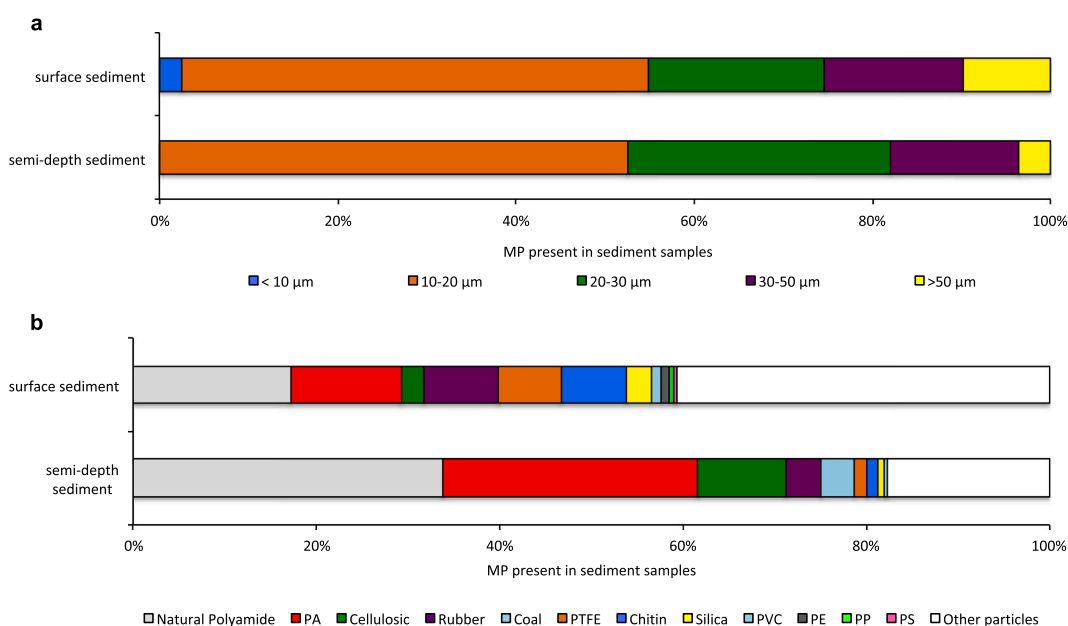


Fig. 5. (a) Relative microplastic particle size distribution of all analyzed samples, (b) polymer characterization for MP particles, in surface and semi-depth sediments.

were obtained running the MS on full scan mode with a mass ranging between 10 and 550 amu (atomic mass unit). Polymers were identified by accessing to a database published by Tsuge et al. (2011) and comparing the pyrograms with those created using pre-identified polymers at disposal in our laboratory.

2.4.2. Quantification of PAHs and phthalates in MPs

One milligram of each plastic type was precisely weighed before being transferred to a pyrolysis vial. A GC–MS analysis was performed using a gas chromatograph (Agilent 7890N) equipped with a Combipal MPS2 multifunctional injection system (Gerstel, Switzerland) on 'splitless' mode and a pyrolyzer (Gerstel Pyro). The cooling injection system (CIS) was programmed from $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ (0.05 min) to $340\text{ }^{\circ}\text{C}$ (4 min) at $12\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$. During the desorption phase, the interface temperature was maintained at $350\text{ }^{\circ}\text{C}$. The oven temperature program was set from $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (0.5 min) to $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ at $15\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, then up to $315\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5 min) at $7\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. The helium carrier gas was at a constant rate of $1.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The capillary column was an HP-5-MS (Agilent Technologies): $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm ID} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ (film thickness). The chromatograph was coupled to a 5975N mass spectrometry detector. A semi-quantitative compound analysis was carried out on single ion monitoring (SIM) mode, with the molecular ion of each compound of interest (minimum of 1.5 cycles. s^{-1}). The results from these analyzes are therefore represented by semi-quantification, that is to say that we do not determine the exact concentration of the vectorized/additives substances on the plastics but rather those which are more or less present. Limits of quantification (LOQ) were calculated according to Shrivastava and Gupta's (2011) calibration curve method. Using a calibration curve ranging from 0.01 ng to 10 ng, analytes were relatively quantified to deuterated. For PAHs quantification, the standards used were: naphthalene d_8 , biphenyl d_{10} , phenanthrene d_{10} , pyrene d_{10} , chrysene d_{12} , benzo(a)pyrene d_{12} , benzo(g,h,i)perylene d_{12} . With regards to plastic additives, the standards were: phthalates and PBDE, di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) d_4 and BDE 77. All standards were obtained from LGC Standard (Wesel, Germany) and Interchim (Montluçon, France).

2.5. Statistics

The statistical analysis was conducted using R Studio and graphs on

Microsoft Excel. Homogeneity of variance (Levene's test) and normality of distribution (Shapiro-Wilk) were assessed. In order to compare the various treatments, an analysis of variance (ANOVA) using Tukey's post-hoc test was performed, to compare plastics type collected, and microplastics sediments (surface vs semi-depth) abundance. When $p < 0.05$, significance was tolerated. Data are written as mean \pm SEM.

3. Results and discussion

3.1. Collection of macroplastic waste and focus on oyster plastics materials

The collection of plastic waste on the beach did not highlight significant difference between the four sampling periods. Therefore, we decided to pool the results. We collected a total amount of 8509 kg of plastics, corresponding to 550 items. In Fig. 2a, the most commonly found plastics were of aquaculture origin (used in the oyster farms professional sector), representing 70% of all plastic waste collected. We also found plastic packaging (5%), cigarette butts (3%), unidentified plastics and other types of waste. In Fig. 2b, we focused on the aquaculture materials found and noted that the most common plastics were oyster collection cups and pipe collectors, with respectively $34 \pm 11\%$ and $33 \pm 10\%$, with a significantly difference than other plastics collected. Mussel nets and fishing lines represented $17 \pm 8\%$ and $9 \pm 3\%$ respectively. Oyster crop pieces and rubber bands (elastic bands) represented a small portion of the plastics collected. In our work, we observed that a large quantity of plastic waste from aquaculture origin reached the coast because of ocean currents, due to the strong winds present in this geographical area. Similar observations were made in Hawaii, as part of a previous study, with the presence of plastic aquaculture tools present in large quantities following strong sea currents (Kataoka et al., 2015). A study had already identified the presence of plastic waste due to the local oyster farming profession. It had a huge impact on the pollution of Taiwan coastlines (Liu et al., 2015). Similar observations have already been made in the Spanish Mediterranean sector, with macroplastics collected from fish farming facilities (Krüger et al., 2020). Abundances of macroplastics have been found on beaches in Korea, with 51% of plastics collected from fisheries and aquaculture (Hong et al., 2014). Previous research (Lee et al., 2013; Lee et al., 2015)

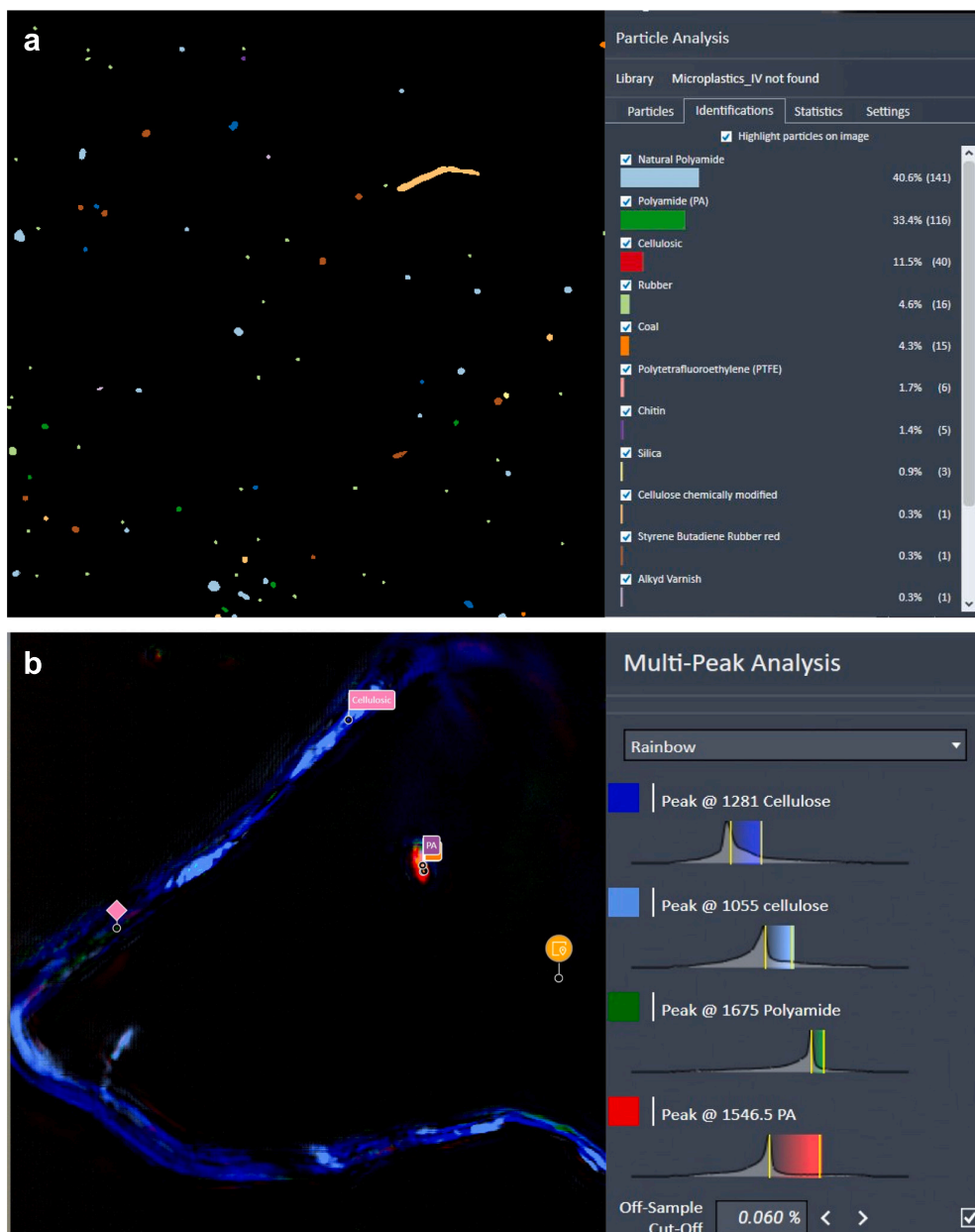


Fig. 6. (a) Different kinds of polymers detected (Agilent LDIR 8700 Automatic MP workflow) and (b) example of multi components of mixed fiber consisting of cellulose and PA (Clarity Software of the Agilent LDIR 8700).

also suggested that polystyrene buoys from aquaculture were the main source of high polystyrene pollution on the south coast of Korea. Nevertheless, some areas, such as the Salish Sea (Pacific, USA) have shown survey data on the sources of marine plastic debris, demonstrating the very limited contribution of aquaculture gear (Schoof and DeNike, 2017). Depending on the geographical sectors, aquaculture activities can be the source of plastic pollution on coasts and beaches. Through GCMS pyrolysis, we analyzed the three most representative polymers of the oyster farming profession (Lusher et al., 2017), i.e. the oyster enlargement crops, the collection cups and the collection pipes, collected on beach area. They were selected for their abundance and mostly frequent usage in oyster farm production. In Fig. 3a, b & c, we characterized the three materials by comparing them to already identified polymers. The oyster crops are mainly made of PE, the cup

collectors of PP and the pipe collectors of PVC. We were able to check and compare the panels extracted by GC-MS pyrolysis to ensure that we were in the presence of PE (Fries et al., 2013) for the oyster crops, PP (Sojak et al., 2006) for the cups collector and PVC (Arbin et al., 1986) for pipes collector.

3.2. Sediment sampling and microplastics characterization

The protocol for sampling the sediment on the beach proposed by the MSFD/TSG-ML (MSFD Technical Subgroup on Marine Litter, 2013) takes into account the major work carried out in this field, in particular that of Hidalgo-Ruz et al. (2012), who synthesize about 40 references addressing the abundance of MPs in beach sediment. The microparticles are either deposited on the sand or buried in the sediment. Most often,

CHAPITRE III – Évaluation & caractérisation de la pollution aux microplastiques sur un site d'étude pilote des Pertuis Charentais

A. Bringer et al.

Marine Pollution Bulletin 167 (2021) 112286

Table. 1
Comparison on abundance of microplastics in sediments (different units) on European coast, next to present study area (South-West, France).

Country/location	Habitat	Abundance	Unit	References
Mediterranean Sea	Coastal sediment	101–897	Items.kg ⁻¹	(Alomar et al., 2016)
Mediterranean sea	Beach sediment	12–798	Items.kg ⁻¹	(Constant et al., 2019)
Tyrrhenian Sea	Coastal sediment	42–1069	items.kg ⁻¹	(Cannas et al., 2017)
Baltic Sea	Bottom sediment	34	Items.kg ⁻¹	(Zobkov and Esiukova, 2017)
Tenerife	Beach sediment	2–15	Items.m ⁻²	(Álvarez-Hernández et al., 2019)
Lanzarote	Beach sediment	36	g.m ⁻²	(Edo et al., 2019)
Manche Sea (France)	Coastal sediment	481	Items.kg ⁻¹	(Maes et al., 2017)
Netherlands	Beach sediment	200–1500	Items.kg ⁻¹	(Besley et al., 2017)
Algeria	Beach sediment	649	Items.kg ⁻¹	(Tata et al., 2020)
Italy	Lagoon sediment	672–2175	Items.kg ⁻¹	(Vianello et al., 2018)
Italy	Lakeshore sediment	112–234	Items.kg ⁻¹	(Fischer et al., 2016)
Germany	Beach sediment	671	Items.kg ⁻¹	(Liebezeit and Dubaish, 2012)
Poland	Marine/beach sediment	39	Items.kg ⁻¹	(Graca et al., 2017)
Atlantic South-West	Beach sediment	397–457	Items.kg ⁻¹	Present study

the microparticles are less detectable because they are found inside the sediments, either buried under a layer of sand (from a few mm to several tens of cm) following a reworking or mixing of the sand, or infiltrated by penetration within a bead of pebbles.

Particles buried in the sediment are likely to stay longer in the same part of the beach (in the absence of significant sand disturbance). They therefore reflect the state of the site's more or less chronic contamination (Macadré et al., 2018). Conversely, the freshly washed up microparticles on the surface of the beach are *a priori* simply in transit because they are very likely to be picked up by the waves, or the following tide, then redeposited in another place on the beach or on the nearby coast. They correspond to a recent arrival, very probably ephemeral (at the level of the section monitored for surveillance).

In our work, MPs, sampled in the coastal sandy sediments of our selected area, were categorized in sizes and characterized. It seems relevant to analyze sediments at the surface and semi-depth. Indeed, tidal movements could incorporate potential MPs deeper into the sediments. In addition, the previous study by (Xue et al., 2020) showed the presence of aquaculture MPs in marine surface sediments but also in large concentrations at depth. Whether in surface or in semi-depth sediments, the MPs observed were fibers or particles (Fig. 4b & c). We

noted that MPs were present in our control samples, probably due to external contamination during the analyses and experiments (Fig. 4a). However, very small amounts of MPs were observed in quality control samples (2 ± 0.4 MPs). Nevertheless, it is difficult to assess the external contamination on the sediment samples. The size classifications underlined that the greatest abundance of MPs in sediments was of 10–20 μm , with respectively 52% in surface sediments and 52% in semi-deep sediments. MPs < 10 μm were only present in very small quantities in surface sediments. MPs of 20–30 μm were more present in semi-depth sediments with 29% than in surface sediments (20%, Fig. 5a). With regards to their nature, we found a greater variety of polymers (Fig. 6a), 11 detected, in surface sediments. The most common was natural polyamide and polyamide (PA), with respectively 17%, 12% in surface and 34% and 28% in semi-depth sediments (Fig. 6b). Traces of polymers, such as PE, PP and PVC, were only analyzed for surface samples (Fig. 5b). Fig. 4d, documented a concentration of 397.2 MP.kg⁻¹ in surface sediments and 457.1 MP.kg⁻¹ in semi-depth sediments (5 cm). However, no significant difference was observed between surface and semi-depth MPs concentrations in beach sediments. This analysis can be confirmed by a study conducted by Asadi et al. (2019) where there was no significant difference between the abundance of MPs at depths of 0 to

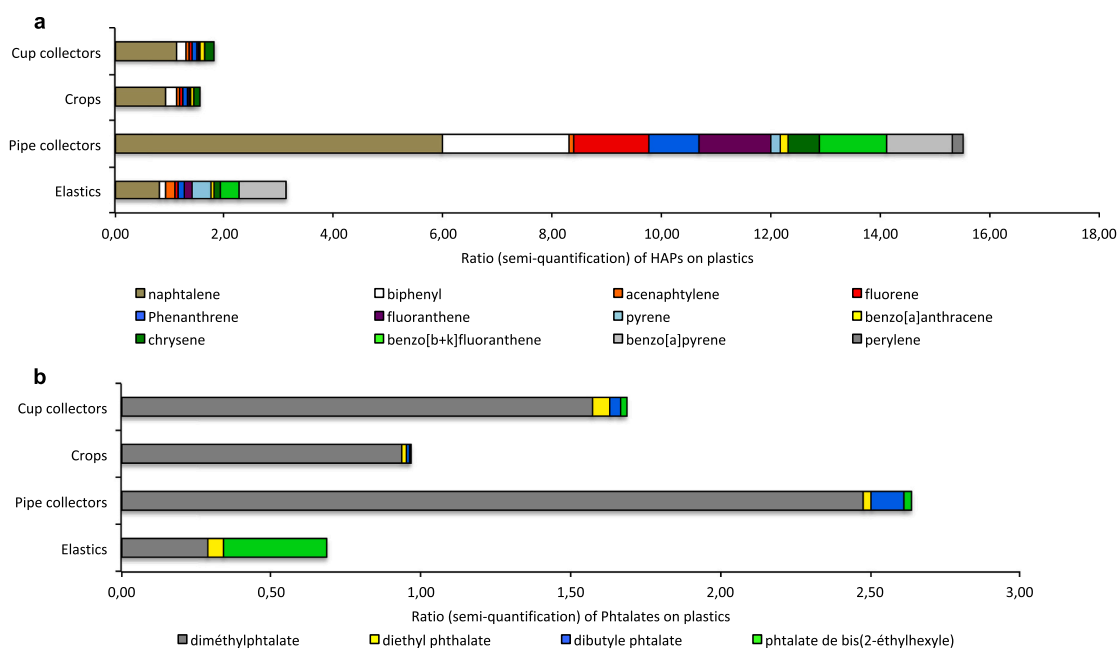


Fig. 7. Histograms represent (a) HAPs ratio (semi-quantification) and (b) phthalates ratio (semi-quantification) on shellfish plastics.

5 cm and 5 to 10 cm of sediment. However, the texture of the sediments may contribute to a higher concentration of MPs in some areas.

We tried to verify if the MPs present in the sediments are likely to be the MPs of macroplastics used in aquaculture. Very few traces of PE, PP and PVC were found, with only 1.1% of PVC MPs in surface sediments. A previous study reported that very few MPs were referenced as PE or PP in samples of sandy sediments (Lots et al., 2017). Nevertheless, we noted larger amounts of rubber elastomer, meaning the elastic bands used in oyster farming to attach crops (Mazurie et al., 2001). We can suggest several hypotheses, that aquaculture macroplastics are poorly represented as MPs in beach sediments. They could potentially be found in higher concentrations in marine sediments. Indeed, the small distance between the aquaculture areas and the beach sediment sampling area could be a reason for the low degradation of macroplastic materials into MPs. The previous study by Brandon et al. (2016) shows that some MPs had fairly long residence times in the open sea before being sampled. However, a previous study pointed out that most microparticles were not detected due to a lack of observation techniques (Song et al., 2018). Thus, although they were not detected, smaller microparticles could be present in the sampled sediments. The most abundant size classification in our beach sediment samples was 10 to 20 μm . This can be confirmed by a previous study, which demonstrated that most of the MPs analyzed in sandy sediments were less than 1 mm (Lots et al., 2017). Few studies have looked at small MPs in beach sediments. Indeed, only five articles worked on MPs < 1 mm present in sediments (Besley et al., 2017).

With regards to abundance, we demonstrated that the selected area was strongly impacted by MP pollution (Table 1). In previous studies, concentrations of 671 items.kg⁻¹ were recorded on a German beach (Liebezeit and Dubaish, 2012) and of approximately 200–1500 items.kg⁻¹ on a Dutch beach (Besley et al., 2017). Both were located in strongly industrialized regions. Remote areas highlighted much lower concentrations, with 39 items.kg⁻¹ on a Polish beach (Graca et al., 2017) and 112–234 items.kg⁻¹ on an Italian beach (Fischer et al., 2016). The concentrations found did not always have similar size classifications as in our study. They also showed significant heterogeneity, depending on the analyses carried out and the spatial variation (Besley et al., 2017; Lots et al., 2017). In this present study, our results approximate the results published by Maes et al. (2017) with concentrations of around 481 items.kg⁻¹ in the Manche Sea (France).

3.3. Chemical characterization of oyster plastics materials

Thus, we characterized the PAHs and phthalates, of aquaculture materials used regularly focus (PE oyster crops, PP cups and PVC pipes collector). First, we noticed that several molecules of PAHs were present on PVC. Nonetheless, the most present polymer, among the ones that were tested, was naphthalene (Fig. 7a). With regards to phthalates, a greater presence of dimethyl phthalate (DMP) was observed on PVC (ratio of 2.48) compared to PP (ratio of 1.57) and PE (ratio of 0.94). Other studies observed the presence of PAHs on plastics that had drifted towards the coast, particularly in Japan (Mato et al., 2001; Endo et al., 2005; Takada et al., 2006), California (Van et al., 2012) and Mexico (Rios et al., 2007). We reported that PVC was the plastic with the most naphthalene on its surface. A study by Zhou et al. (2015) indicated that PVC was one of the polymers with the most accumulated PAHs, in particular naphthalene. It also highlighted the presence of fluorene and phenanthrene on plastics, echoing our study. In addition, we observed the presence of biphenyl, which was greater on PVC. This had previously been documented in a study by Fisner et al. (2013b). In our work, the PAHs detected on plastics were molecules that were commonly less studied (Hylland, 2006) than benzo(a)pyrene. The mechanisms of non-carcinogenic PAHs had impacts on oxidative stress (Dizdaroglu et al., 2002) as well as on the immune system (Holladay et al., 1998), the endocrine regulation (Gozgit et al., 2004; Navas and Segner, 2000) and the development (Rhodes et al., 2005). The PAHs accumulation on oyster plastics could generate a facilitated bioaccumulation for

exploited oysters and their environment. With regards to phthalates, we noted a DMP presence on the three plastics studied. Their quantity was higher on PVC and PE, corresponding to collection pipes and oyster crops. One of the most widely used phthalates in cellulose ester-based plastics, DMP was quite stable in aquatic environment which had a hydrolytic half-life period superior to 3 years (Jia et al., 2018). DMP are suspected for endocrine disruptive activity (Harris et al., 1997). Phthalates, its esters and its degradation intermediates could cause cancer and kidney damage (Pirsaheb et al., 2009). Another study documented that phthalates, in particular DMP, caused malformations and developmental abnormalities in the embryos of *H. diversicolor supertexta* (Liu et al., 2009). The toxicity of phthalates, in particular DMP, led to malformations in oyster larvae (de Araujo et al., 2015).

More in-depth research is key to study the potential toxic effects of substances retrieved on plastics (PAHs and phthalates). In addition, plastics from the marine profession interact closely with filtering organisms, like bivalves, which could potentially be more harmful than drifting plastics. The management of abandoned oyster farm plastics found on the coastline should be improved in order to avoid additional sources of contamination in sediments.

4. Conclusions and perspectives

The oyster culture of Pertuis Charentais represents each year a turnover of 277 million euros and a production of 43,400 t of oysters (*i.e.* 55% of national production, Caill-Milly et al., 2018). This present study is the first to highlight the characterization and identification of additives (phthalates) on plastic materials used in local aquaculture. We were able to put in evidence that the PVC pipe collectors vectorized in greater quantity the PAHs and phthalates such as DMP. In addition, we were able to observe that the small MPs (10–20 μm) were found in the beach sandy sediments of an area subject to strandings of aquaculture plastics. However, few traces of aquaculture macroplastics found in the beach sediments, like PE, PP and PVC. New aquaculture materials made from bio-based materials could help prevent contamination of beach sediments by MPs, potentially resulting from fragmentation and deterioration of macroplastics.

CRedit authorship contribution statement

Arno Bringer: Investigation, Methodology, Formal analysis, Visualization, Writing – original draft, Funding acquisition. **Stéphane Le Floch:** Investigation, Validation. **Andreas Kerstan:** Formal analysis, Methodology. **Hélène Thomas:** Conceptualization, Methodology, Validation, Writing – review & editing, Funding acquisition, Supervision.

Declaration of competing interest

We declare that we have no competing financial interests or known personal relationships that could have seemed to influence the work reported in this article.

Acknowledgements

Arno Bringer received a PhD grant (Comité Régional de la Conchyliculture de la Charente-Maritime CRC17) as well as financial support from the Région Nouvelle Aquitaine and the Comité Départemental de la Charente Maritime (CD17) to develop his research. The AQUA-ECOs project (Amélioration de la QUALité Environnementale sur les zones Conchylicoles des Pertuis Charentais), a partnership with CRC17 and the AFB (French Biodiversity Agency) contributed to this study. Funds were also given by the University of La Rochelle, the University of Bordeaux, the Centre National de la Recherche Scientifique (France). We would like to thank SCIC TEO (La Rochelle, France) for our collaboration around these themes. We wish to thank our collaborators for their work and help.

CHAPITRE III – Évaluation & caractérisation de la pollution aux microplastiques sur un site d'étude pilote des Pertuis Charentais

A. Bringer et al.

Marine Pollution Bulletin 167 (2021) 112286

References

- Alomar, C., Estarellas, F., Deudero, S., 2016. Microplastics in the Mediterranean Sea: deposition in coastal shallow sediments, spatial variation and preferential grain size. *Mar. Environ. Res.* 115, 1–10.
- Álvarez-Hernández, C., Cairós, C., López-Darías, J., Mazzetti, E., Hernández-Sánchez, C., González-Sálamo, J., Hernández-Borges, J., 2019. Microplastic debris in beaches of Tenerife (Canary Islands, Spain). *Mar. Pollut. Bull.* 146, 26–32.
- Andrady, A.L., 2017. The plastic in microplastics: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 119 (1), 12–22.
- Arbin, A., Jacobsson, S., Hänninen, K., Hagman, A., Östelius, J., 1986. Studies on contamination of intravenous solutions from PVC-bags with dynamic headspace GC-MS and LC-diode array techniques. *Int. J. Pharm.* 28 (2–3), 211–218.
- Asadi, M.A., Hertika, A.M.S., Iranawati, F., Yuwandita, A.Y., 2019. Microplastics in the sediment of intertidal areas of Lamongan, Indonesia. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation* 12 (4), 1065–1073.
- Avio, C.G., Gorb, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., Regoli, F., 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental pollution* 198, 211–222.
- Baalkhuyur, F.M., Qurban, M.A., Panickan, P., Duarte, C.M., 2020. Microplastics in fishes of commercial and ecological importance from the Western Arabian Gulf. *Mar. Pollut. Bull.* 152, 110920.
- Besley, A., Vijver, M.G., Behrens, P., Bosker, T., 2017. A standardized method for sampling and extraction methods for quantifying microplastics in beach sand. *Mar. Pollut. Bull.* 114 (1), 77–83.
- Brandon, J., Goldstein, M., Ohman, M.D., 2016. Long-term aging and degradation of microplastic particles: comparing *in situ* oceanic and experimental weathering patterns. *Mar. Pollut. Bull.* 110 (1), 299–308.
- Bringer, A., Thomas, H., Prunier, G., Dubillot, E., Bossut, N., Churlaud, C., Clérandeau, C., Le Bihanic, F., Cachot, J., 2020. High density polyethylene (HDPE) microplastics impair development and swimming activity of Pacific oyster *D-larvae*, *Crassostrea gigas*, depending on particle size. *Environmental Pollution* 260, 113978.
- Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M., Thompson, R.C., 2008. Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental science & technology* 42 (13), 5026–5031.
- Cai, L., Wang, J., Peng, J., Tan, Z., Zhan, Z., Tan, X., Chen, Q., 2017. Characteristic of microplastics in the atmospheric fallout from Dongguan city, China: preliminary research and first evidence. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (32), 24928–24935.
- Caill-Milly, N., Morandea, G., Castege, I., Sanchez, F., Lissardy, M., Chust, G., Borja, A., Auby, I., Lapegue, S., Prou, J., Oger-Jeanneret, H., 2018. Les ressources exploitées par la pêche et la conchyliculture. *Acclimaterra. Anticiper les changements climatiques en Nouvelle-Aquitaine. Rapport synthétique.*
- Cannas, S., Fastelli, P., Guerranti, C., Renzi, M., 2017. Plastic litter in sediments from the coasts of south Tuscany (Tyrrhenian Sea). *Mar. Pollut. Bull.* 119 (1), 372–375.
- Caruso, G., 2019. Microplastics as vectors of contaminants. *Mar. Pollut. Bull.* 146, 921–924.
- Chen, M., Jin, M., Tao, P., Wang, Z., Xie, W., Yu, X., Wang, K., 2018. Assessment of microplastics derived from mariculture in Xiangshan Bay, China. *Environ. Pollut.* 242, 1146–1156.
- Claessens, M., De Meester, S., Van Landuyt, L., De Clerck, K., Janssen, C.R., 2011. Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. *Mar. Pollut. Bull.* 62 (10), 2199–2204.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., Galloway, T. S., 2013. Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental science & technology* 47 (12), 6646–6655.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine pollution bulletin* 62 (12), 2588–2597.
- Constant, M., Kerhervé, P., Mino-Verceillo-Vorollet, M., Dumontier, M., Vidal, A.S., Canals, M., Heussner, S., 2019. Beached microplastics in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 142, 263–273.
- de Araujo, M.M.S., Menezes Filho, A., Nascimento, I.A., Pereira, P.A.P., 2015. Lightsticks content toxicity: effects of the water-soluble fraction on the oyster embryonic development. *Chemosphere* 139, 73–80.
- Directive, S.F., 2013. Guidance on monitoring of marine litter in European seas. Luxembourg: Publications Office of the European Union, doi 10, 99475.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioğlu, M., Rodriguez, H., 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1102–1115.
- do Sul, J.A.L., Costa, M.F., 2014. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environmental pollution* 185, 352–364.
- Edo, C., Tamayo-Belda, M., Martínez-Campos, S., Martín-Betancor, K., González-Pleiter, M., Pulido-Reyes, G., García-Ruiz, C., Zapata, F., Leganés, F., Fernández-Piñas, F., Rosal, R., 2019. Occurrence and identification of microplastics along a beach in the Biosphere Reserve of Lanzarote. *Mar. Pollut. Bull.* 143, 220–227.
- Endo, S., Takizawa, R., Okuda, K., Takada, H., Chiba, K., Kanehiro, H., Ogi, H., Yamashita, R., Date, T., 2005. Concentration of polychlorinated biphenyls (PCBs) in beached resin pellets: variability among individual particles and regional differences. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1103–1114.
- Enfrin, M., Dumée, L.F., Lee, J., 2019. Nano/microplastics in water and wastewater treatment processes—origin, impact and potential solutions. *Water Res.* 161, 621–638.
- Fischer, E.K., Paglialonga, L., Czech, E., Tamminga, M., 2016. Microplastic pollution in lakes and lake shoreline sediments – a case study on Lake Bolsena and Lake Chiusi (central Italy). *Environ. Pollut.* 213, 648–657.
- Fisner, M., Taniguchi, S., Majer, A.P., Bicego, M.C., Turra, A., 2013a. Concentration and composition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plastic pellets: implications for small-scale diagnostic and environmental monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 76 (1–2), 349–354.
- Fisner, M., Taniguchi, S., Moreira, F., Bicego, M.C., Turra, A., 2013b. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plastic pellets: variability in the concentration and composition at different sediments depths in a sandy beach. *Mar. Pollut. Bull.* 70 (1–2), 219–226.
- Fries, E., Dekiff, J.H., Willmeyer, J., Nuelle, M.T., Ebert, M., Remy, D., 2013. Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. *Environ Sci Process Impacts* 15 (10), 1949–1956.
- Galgani, F., Hanke, G., Werner, S.D.V.L., De Vrees, L., 2013. Marine litter within the European marine strategy framework directive. *ICES J. Mar. Sci.* 70 (6), 1055–1064.
- Gerigny, O., Brun, M., Tomasino, C., Lacroix, C., Kerambrun, L., Galgani, F., 2018. Évaluation du Descripteur 10 “Déchets Marins” en France Métropolitaine. *Rapport Scientifique Pour l'évaluation.*
- Gigault, J., Pedrono, B., Maxit, B., Ter-Halle, A., 2016. Marine plastic litter: the unanalyzed nano-fraction. *Environmental science: nano* 3 (2), 346–350.
- Godswill, A.C., Godspel, A.C., 2019. Physiological effects of plastic wastes on the endocrine system (bisphenol A, phthalates, bisphenol S, PBDEs, TBBPA). *International Journal of Bioinformatics and Computational Biology* 4 (2), 11–29.
- Gouin, T., Roche, N., Lohmann, R., Hodges, G., 2011. A thermodynamic approach for assessing the environmental exposure of chemicals adsorbed to microplastic. *Environmental Science & Technology* 45 (4), 1466–1472.
- Gozgit, J.M., Nestor, K.M., Fasco, M.J., Pentecost, B.T., Arcaro, K.F., 2004. Differential action of polycyclic aromatic hydrocarbons on endogenous estrogen-responsive genes and on a transfected estrogen-responsive reporter in MCF-7 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 58–67.
- Graca, B., Szwec, K., Zakrzewska, D., Dołęga, A., Szczerbowska-Boruchowska, M., 2017. Sources and fate of microplastics in marine and beach sediments of the Southern Baltic Sea—a preliminary study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 7650–7661.
- Halpern, B.S., McLeod, K.L., Rosenberg, A.A., Crowder, L.B., 2008. Managing for cumulative impacts in ecosystem-based management through ocean zoning. *Ocean & Coastal Management* 51 (3), 203–211.
- Harris, C.A., Henttu, P., Parker, M.G., Sumpter, J.P., 1997. The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ. Health Perspect.* 105 (8), 802–811.
- Hengstmann, E., Tamminga, M., Vom Bruch, C., Fischer, E.K., 2018. Microplastic in beach sediments of the Isle of Rügen (Baltic Sea) - implementing a novel glass elutriation column. *Mar. Pollut. Bull.* 126, 263–274.
- Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C., Thiel, M., 2012. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. *Environmental Science & Technology* 46 (6), 3060–3075.
- Hodson, M.E., Duffus-Hodson, C.A., Clark, A., Prendergast-Miller, M.T., Thorpe, K.L., 2017. Plastic bag derived-microplastics as a vector for metal exposure in terrestrial invertebrates. *Environmental Science & Technology* 51 (8), 4714–4721.
- Holladay, S.D., Smith, S.A., Besteman, E.G., Deyab, A.S.M.I., Gogal, R.M., Hrubec, T., Robertson, J.L., Ahmed, S.A., 1998. Benzo[a]pyrene-induced hypocoelularity of the pronephros in tilapia (*Oreochromis niloticus*) is accompanied by alterations in stromal and parenchymal cells and by enhanced immune cell apoptosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64, 69–82.
- Hong, S., Lee, J., Kang, D., Choi, H.W., Ko, S.H., 2014. Quantities, composition, and sources of beach debris in Korea from the results of nationwide monitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 84 (1–2), 27–34.
- Hylland, K., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. *J. Toxic. Environ. Health A* 69 (1–2), 109–123.
- Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., Law, K.L., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* 347 (6223), 768–771.
- Jang, M., Shim, W.J., Cho, Y., Han, G.M., Song, Y.K., Hong, S.H., 2020. A close relationship between microplastic contamination and coastal area use pattern. *Water Res.* 171, 115400.
- Jia, H., Cao, Y., Qu, G., Wang, T., Guo, X., Xia, T., 2018. Dimethyl phthalate contaminated soil remediation by dielectric barrier discharge: performance and residual toxicity. *Chem. Eng. J.* 351, 1076–1084.
- Kataoka, T., Hinata, H., Kato, S., 2015. Backwash process of marine macroplastics from a beach by nearshore currents around a submerged breakwater. *Mar. Pollut. Bull.* 101 (2), 539–548.
- Krüger, L., Casado-Coy, N., Valle, C., Ramos, M., Sanchez-Jerez, P., Gago, J., Carretero, O., Beltran-Sanahuja, A., Sanz-Lazaro, C., 2020. Plastic debris accumulation in the seabed derived from coastal fish farming. *Environ. Pollut.* 257, 113336.
- Lambert, S., Wagner, M., 2016. Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene. *Chemosphere* 145, 265–268.
- Lau, W.W., Shiran, Y., Bailey, R.M., Cook, E., Stuchtey, M.R., Koskella, J., Palardy, J.E., 2020. Evaluating scenarios toward zero plastic pollution. *Science* 369 (6510), 1455–1461.
- Law, R.J., Kelly, C., Baker, K., Jones, J., McIntosh, A.D., Moffat, C.F., 2002. Toxic equivalency factors for PAH and their applicability in shellfish pollution monitoring studies. *J. Environ. Monit.* 4 (3), 383–388.
- Lee, J., Hong, S., Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, Y.C., Jang, M., Heo, N.W., Han, G.M., Lee, M.J., Kang, D., Shim, W.J., 2013. Relationships among the abundances of plastic debris in different size classes on beaches in South Korea. *Mar. Pollut. Bull.* 77 (1–2), 349–354.
- Lee, J., Lee, J.S., Jang, Y.C., Hong, S.Y., Shim, W.J., Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, M., Han, G.M., Kang, D., Hong, S., 2015. Distribution and size relationships of plastic marine debris on beaches in South Korea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 69 (3), 288–298.

CHAPITRE III – Évaluation & caractérisation de la pollution aux microplastiques sur un site d'étude pilote des Pertuis Charentais

A. Bringer et al.

Marine Pollution Bulletin 167 (2021) 112286

- León, V.M., García-Aguiera, I., Moltó, V., Fernández-González, V., Llorca-Pérez, L., Andrade, J.M., Muniategui-Lorenzo, S., Campillo, J.A., 2019. PAHs, pesticides, personal care products and plastic additives in plastic debris from Spanish Mediterranean beaches. *Sci. Total Environ.* 670, 672–684.
- Liebezeit, G., Dubaish, F., 2012. Microplastics in beaches of the East Frisian Islands Spiekeroog and Kachelotplate. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89, 213–217.
- Liu, Y., Guan, Y., Yang, Z., Cai, Z., Mizuno, T., Tsuno, H., Zhang, X., 2009. Toxicity of seven phthalate esters to embryonic development of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Ecotoxicology* 18 (3), 293–303.
- Liu, T.K., Kao, J.C., Chen, P., 2015. Tragedy of the unwanted commons: governing the marine debris in Taiwan's oyster farming. *Mar. Policy* 53, 123–130.
- Lots, F.A., Behrens, P., Vijver, M.G., Horton, A.A., Bosker, T., 2017. A large-scale investigation of microplastic contamination: abundance and characteristics of microplastics in European beach sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 123 (1–2), 219–226.
- Lundstedt, S., White, P.A., Lemieux, C.L., Lynes, K.D., Lambert, I.B., Öberg, L., Tysklind, M., 2007. Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH-contaminated sites. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 36 (6), 475–485.
- Lusher, A., Hollman, P., & Mendoza-Hill, J. (2017). Microplastics in fisheries and aquaculture. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper (FAO) eng no. 615*.
- Macadré, T., Lacroix, C., Duboscq, K., Richard, P., & Kerambrun, L. (2018). Evaluation of a microplastic sediment separator in the context of MSFD beach microplastic monitoring. In *MICRO 2018. Fate and Impact of Microplastics: Knowledge, Actions and Solutions* (p. 367). *MSFS-RBLZ*.
- Maes, T., van der Meulen, M., Devriese, L.I., Leslie, H.A., Huvet, A., Frère, L., Robbens, J., Vethaak, A.D., 2017. Microplastics baseline surveys at the water surface and in sediments of the North-East Atlantic. *Front. Mar. Sci.* 4, 135.
- Maharana, D., Saha, M., Dar, J.Y., Rathore, C., Sreepada, R.A., Xu, X.R., Bimali-Koongolla, J., Li, H.X., 2020. Assessment of micro and macroplastics along the west coast of India: abundance, distribution, polymer type and toxicity. *Chemosphere* 246, 125708.
- Manalu, A.A., Hariyadi, S., Wardiatno, Y., 2017. Microplastics abundance in coastal sediments of Jakarta Bay, Indonesia. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation* 10 (5), 1164–1173.
- Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., Kaminuma, T., 2001. Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environ. Sci. Technol.* 35, 318–324.
- Mazeaud, A., Bénéitez, F., Ridel, A., Bringer, A., Plumejeaud, C., Brunello, P., Lerebours, A., Rabuteau, Y., Thomas, H. Governance and public policies of coastal water quality in the "Pertuis Charentais". In F. MUTTIN and H. THOMAS (Eds.), *Marine Environmental Quality, Healthy Coastal Water*, chapter 7, p. 139–150, ISTE, London, submitted December 2020.
- Mazuric, J., Bouget, J.F., Claude, S., Fleury, P.G., Langlade, A., 2001. Comparaison des performances d'élevage de moules en 4 sites mytilicoles de la baie de Vilaine, de février 2000 à février 2001.
- Moore, C.J., 2008. Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. *Environ. Res.* 108, 131–139.
- MSFD Technical Subgroup on Marine Litter, 2013. *Guidance on Monitoring of Marine Litter in the European Seas. A Guidance Document Within the Common Implementation Strategy for the Marine Strategy Framework Directive*. Joint Research Center, European Commission (124 p).
- Navas, J.M., Segner, H., 2000. Antiestrogenicity of β -naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. *Aquat. Toxicol.* 51, 79–92.
- Net, S., Rabodonirina, S., Sghaier, R.B., Dumoulin, D., Chhib, C., Tlili, I., Ouddane, B., 2015. Distribution of phthalates, pesticides and drug residues in the dissolved, particulate and sedimentary phases from transboundary rivers (France–Belgium). *Science of the total environment* 521, 152–159.
- Neves, D., Sobral, P., Ferreira, J.L., Pereira, T., 2015. Ingestion of microplastics by commercial fish off the Portuguese coast. *Marine pollution bulletin* 101 (1), 119–126.
- OSPAR Commission, 2010. *Guideline for Monitoring Marine Litter on the Beaches in the OSPAR Maritime Area*. OSPAR Commission, London.
- Paço, A., Duarte, K., da Costa, J.P., Santos, P.S., Pereira, R., Pereira, M.E., Freitas, A.C., Duarte, A.C., Rocha-Santos, T.A., 2017. Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. *Sci. Total Environ.* 586, 10–15.
- Phuong, N.N., Poirier, L., Pham, Q.T., Lagarde, F., Zalouk-Vergnoux, A., 2018. Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: location, season and/or mode of life?. *Marine Pollution Bulletin* 129 (2), 664–674.
- Pirsaheb, M., Mesdaghinia, A.R., Shahtaheri, S.J., Zinatizadeh, A.A., 2009. Kinetic evaluation and process performance of a fixed film bioreactor removing phthalic acid and dimethyl phthalate. *J. Hazard. Mater.* 167 (1–3), 500–506.
- PlasticsEurope, 2019. *Plastics-The Facts 2019*. PlasticsEurope, Brussels, Belgium. <https://www.plasticseurope.org/fr/resources/publications/1804-plastics-facts-2019>.
- PlasticsEurope, 2020. *Plastics - The Facts 2020*. Brussels, Belgium <https://www.plastics-europe.org/fr/resources/publications/4312-plastics-facts-2020>. *PlasticsEurope*.
- Provencher, J.F., Avery-Gomm, S., Liboiron, M., Braune, B.M., Macaulay, J.B., Mallory, M.L., Letcher, R.J., 2018. Are ingested plastics a vector of PCB contamination in northern fulmars from coastal Newfoundland and Labrador? *Environ. Res.* 167, 184–190.
- Rhodes, S., Farwell, A., Hewitt, L.M., MacKinnon, M., Dixon, D.G., 2005. The effects of dimethylated and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of the Japanese medaka. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 60, 247–258.
- Rios, L.M., Moore, C., Jones, P.R., 2007. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1230–1237.
- Rocha-Santos, T., Duarte, A.C., 2015. A critical overview of the analytical approaches to the occurrence, the fate and the behavior of microplastics in the environment. *TRAC Trends in Analytical Chemistry* 65, 47–53.
- Rochman, C.M., Tahir, A., Williams, S.L., Baxa, D.V., Lam, R., Miller, J.T., Teh, F.C., Werorilangi, S., Teh, S.J., 2015. Anthropogenic debris in seafood: plastic debris and fibers from textiles in fish and bivalves sold for human consumption. *Sci. Rep.* 5 (1), 1–10.
- Rodrigues, M.O., Gonçalves, A.M.M., Gonçalves, F.J.M., Nogueira, H., Marques, J.C., Abrantes, N., 2018. Effectiveness of a methodology of microplastics isolation for environmental monitoring in freshwater systems. *Ecol. Indic.* 89, 488–495.
- Ryan, P.G., Weideman, E.A., Perold, V., Moloney, C.L., 2020. Toward balancing the budget: surface macro-plastics dominate the mass of particulate pollution stranded on beaches. *Front. Mar. Sci.* 7, 929.
- Schoof, R.A., DeNike, J., 2017. Microplastics in the context of regulation of commercial shellfish aquaculture operations. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 13 (3), 522–527.
- Serranti, S., Palmieri, R., Bonifazi, G., Cózar, A., 2018. Characterization of microplastic litter from oceans by an innovative approach based on hyperspectral imaging. *Waste Manag.* 76, 117–125.
- Shrivastava, A., Gupta, V.B., 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists* 2 (1), 21.
- Smith, M., Love, D.C., Rochman, C.M., Neff, R.A., 2018. Microplastics in seafood and the implications for human health. *Current Environmental Health Reports* 5 (3), 375–386.
- Sojak, L., Kubinec, R., Jurdakova, H., Hájeková, E., Bajus, M., 2006. GC-MS of polyethylene and polypropylene thermal cracking products. *Petroleum & Coal* 48 (1), 1–14.
- Song, Y.K., Hong, S.H., Eo, S., Jang, M., Han, G.M., Isobe, A., Shim, W.J., 2018. Horizontal and vertical distribution of microplastics in Korean coastal waters. *Environmental science & technology* 52 (21), 12188–12197.
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M.E.J., Le Goic, N., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, J., Robbens, J., Paul-Pont, I., Soudant, P., Huvet, A., 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (9), 2430–2435.
- Takada, H., Mato, Y., Endo, A., Yamashita, R., Zakaria, M.P., 2006. Call for pellets! International pellet watch global monitoring of POPs using beached plastic resin pellets. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 1547–1548.
- Taliec, K., Huvet, A., Di Poi, C., González-Fernández, C., Lambert, C., Petton, B., Le Goic, N., Berchel, M., Soudant, P., Paul-Pont, I., 2018. Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos. *Environmental pollution* 242, 1226–1235.
- Tata, T., Belabed, B.E., Bououdina, M., Bellucci, S., 2020. Occurrence and characterization of surface sediment microplastics and litter from North African coasts of Mediterranean Sea: preliminary research and first evidence. *Sci. Total Environ.* 713, 136664.
- Tsuge, S., Ohtani, H., Watanabe, C., 2011. *Pyrolysis-GC/MS Data Book of Synthetic Polymers: Pyrograms, Thermograms and MS of Pyrolyzates*. Elsevier.
- Turra, A., Manzano, A.B., Dias, R.J.S., Mahiques, M.M., Barbosa, L., Balthazar-Silva, D., Moreira, F.T., 2014. Three-dimensional distribution of plastic pellets in sandy beaches: shifting paradigms. *Sci. Rep.* 4, 4435.
- Ülker, O.C., Ulker, O., 2019. Toxicity of formaldehyde, polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and phthalates in engineered wood products (EWPs) from the perspective of the green approach to materials: a review. *BioResources* 14 (3), 7465–7493.
- US EPA (2012). *Phthalates Action Plan*. U.S. EPA, Washington D.C., USA.
- Van Cauwenbergh, L., Janssen, C.R., 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environ. Pollut.* 193, 65–70.
- Van, A., Rochman, C.M., Flores, E.M., Hill, K.L., Vargas, E., Vargas, S.A., Hoh, E., 2012. Persistent organic pollutants in plastic marine debris found on beaches in San Diego, California. *Chemosphere* 86 (3), 258–263.
- Vianello, A., Da Ros, L., Boldrin, A., Marceta, T., Moschino, V., 2018. First evaluation of floating microplastics in the Northwestern Adriatic Sea. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25 (28), 28546–28561.
- Welden, N.A., & Lusher, A. (2020). *Microplastics: from origin to impacts*. In *Plastic Waste and Recycling* (pp. 223–249). Academic Press.
- Wagner, M., Scherer, C., Alvarez-Munoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., Fries, E., Grosbois, C., Klasmeyer, J., Marti, T., Rodriguez-Mozaz, S., Urbatzka, R., Vethaak, A.D., Winther-Nielsen, M., Reifferscheid, G., 2014. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environmental Sciences Europe* 26 (1), 1–9.
- Worm, B., Lotze, H.K., Jubinville, I., Wilcox, C., Jambeck, J., 2017. Plastic as a persistent marine pollutant. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 42.
- Wright, S.L., Rowe, D., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013. Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Current Biology* 23 (23), R1031–R1033.
- Xue, B., Zhang, L., Li, R., Wang, Y., Guo, J., Yu, K., Wang, S., 2020. Underestimated microplastic pollution derived from fishery activities and "hidden" in deep sediment. *Environmental Science & Technology* 54 (4), 2210–2217.
- Zhou, H., Wu, C., Onwudili, J.A., Meng, A., Zhang, Y., Williams, P.T., 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) formation from the pyrolysis of different municipal solid waste fractions. *Waste Manag.* 36, 136–146.
- Zobkov, M., Esiukova, E., 2017. Microplastics in Baltic bottom sediments: quantification procedures and first results. *Mar. Pollut. Bull.* 114 (2), 724–732.

RÉSULTATS MAJEURS

- ⇒ 70 % des macroplastiques collectés sur le littoral d'Angoulins-sur-mer (site pilote) sont d'origine aquacole (*e.g.* coupelles, tubes, poches, élastiques).
- ⇒ Présence importante de microplastiques dans les sédiments sableux, d'autant plus importante en profondeur (sur 5 cm) avec 457.1 MP.kg^{-1} . La plus grande majorité, des MP trouvés (fibres), mesure entre 10 et 30 μm et sont constitués de Polyamide (PA).
- ⇒ Les matériaux plastiques ostréicoles présentent de forte quantité de naphtalène (HAP) et diméthylphtalate (additif) à leurs surfaces, notamment les tubes de captage en PVC.
- ⇒ Hypothèse : Les MP d'origine ostréicoles sont que très peu présents dans les sédiments de plage. Le faible temps de résidence dans l'environnement marin en serait la raison. Le PVC pourrait être le plastique le plus toxique pour les bivalves à court terme, au vu des plus fortes concentrations en additif et POP à sa surface.

**CHAPITRE IV – Effets des
microplastiques & pesticides aux stades
embryo-larvaire et pédivéligère chez
l’huître creuse (*C. gigas*)**

Préambule

A. Article 2 : Effets des microplastiques commerciaux de différentes tailles de polyéthylène (HDPE) sur le développement et l'activité natatoire au stade embryon-larvaire de l'huître creuse (*C. gigas*)

B. Article 3 : Ingestion et effets sur le développement et le comportement natatoire sur les larves d'huître creuse (*C. gigas*) de microplastiques commerciaux fluorescents

C. Article 4 : Évaluation de la toxicité et des risques pour six pesticides, sur le développement, la croissance et le comportement larvaire de l'huître creuse (*C. gigas*)

D. Article 5 : Effet des microplastiques environnementaux aquacoles vieillissants, sur la fixation des larves pédivéligères et la croissance des naissains chez l'huître creuse (*C. gigas*)

Préambule

L'augmentation des densités humaines sur la frange côtière, ainsi que la mauvaise gestion d'une partie des déchets générés contribuent à accroître la contamination de l'environnement marin par les déchets plastiques et notamment les MP (Eriksen *et al.*, 2014 ; Jambeck *et al.*, 2015). Les MP, de par leurs tailles et leurs dispersions dans l'environnement marin, sont un danger pour les premiers stades de vie de bivalves et notamment l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. De plus, la région des Pertuis Charentais est fortement impactée par l'activité agricole croissante, qui déversent des substances phytosanitaires directement dans les zones côtières, où sont présentes les zones conchylicoles.

Les travaux présentés dans ce chapitre mettent le focus sur les effets des MP commerciaux/environnementaux et pesticides sur les stades précoces de développement chez l'huître creuse, *C. gigas* (Figure 35).

En premier lieu, les potentiels effets des MP de polyéthylène haute-densité (HDPE) commerciaux à différentes tailles, ont été analysés, sur le stade de vie embryon-larvaire chez l'huître creuse, *C. gigas*. Les MP HDPE ont été sélectionnés du fait de leur persistance dans l'environnement marin et sont les polymères de composition des poches ostréicoles utilisées par la profession. Par la suite, six substances pesticides sélectionnées, ont été testées, sur le stade embryon-larvaire. Les six pesticides, quant à eux, ont été sélectionnés du fait de leurs utilisations en agriculture locale et ont été régulièrement dosés dans les eaux des Pertuis Charentais. Des expositions précoces au stade embryonnaire ont été réalisées afin d'analyser plusieurs paramètres physiologiques et comportementaux sur les larve-D à 24 h de développement. Les anomalies de développement, les arrêts de développement, la croissance ainsi que l'activité natatoire ont été analysés pour les différentes expérimentations. Les premiers résultats nous montrent une toxicité des MP de HDPE de petite taille sur le développement embryon-larvaire et la vitesse de nage des larves-D. De plus, un classement du risque environnemental de chaque pesticide testé a été déterminé en fonction des concentrations environnementales retrouvées dans les Pertuis Charentais au niveau de zones conchylicoles entre 2018 et 2020. En complément, l'utilisation de MP (1-5 μm) fluorescents commerciaux ont été testés afin de déterminer les effets d'une ingestion de MP par les larves-D âgées de 72 h. L'étude de la cinétique d'ingestion a été effectuée avec des expositions d'une durée de 1 h, 3 h et 5 h. L'analyse du comportement de nage a aussi été mis en place à ce stade de vie.

Les résultats acquis dans le cadre de ces études, ont mené à l'écriture de trois publications scientifiques. Les résultats d'écotoxicité des HDPE à plusieurs tailles sur le stade embryon-larvaire ont été publiés dans la revue *Environmental Pollution*. L'ingestion et les effets des MP fluorescents (1-5 μm), dans les larves-D de 72 h ont été publiés dans le journal, *Chemosphere*. Pour finir, les effets des six substances pesticides relatives aux contaminations des Pertuis Charentais sur le stade-embryon-larvaire, ont été valorisés dans le journal *Science of the Total Environment*.

Par la suite, nous nous sommes intéressés, aux MP produits à partir de plastiques environnementaux « vieillis » dans le milieu naturel des Pertuis Charentais, collectés sur le site pilote d'Angoulins-sur-mer. Nous avons mis le focus sur trois plastiques ostréicoles majeurs : la coupelle (PP) et le tube de captage (PVC) ainsi que la poche ostréicole (HDPE). Ces macro-déchets ont ensuite été broyés de façon industrielle afin d'obtenir des MP particuliers d'une taille moyenne de 138 μm . On appellera ces MP, dans la suite du texte, pour plus de commodité, MP environnementaux. Une exposition au

CHAPITRE IV – Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryon-larvaire et pédivéligère chez l'huître creuse (*C. gigas*)

stade pédivéligère (larves âgées de 17 jours) a été mise en place avec les MP environnementaux. L'exposition a duré 7 jours, soit le temps de la phase de fixation larvaire. Des systèmes et protocoles aquacoles ont été optimisés pour réaliser cette expérimentation, avec notamment l'utilisation de microbrissures en télécapage pour la fixation en conditions contrôlées. Les larves fixées ont ensuite été maintenues jusqu'au stade naissant avec un suivi de croissance pour les différentes conditions d'expositions. Les résultats obtenus ont été publiés dans le journal *Science of the Total Environment* (*Short communication*). Cette dernière étude permettra de mieux répondre aux attentes des professionnels de la filière ostréicole, sur l'impact des MP sur les premiers stades de vie chez l'huître creuse.

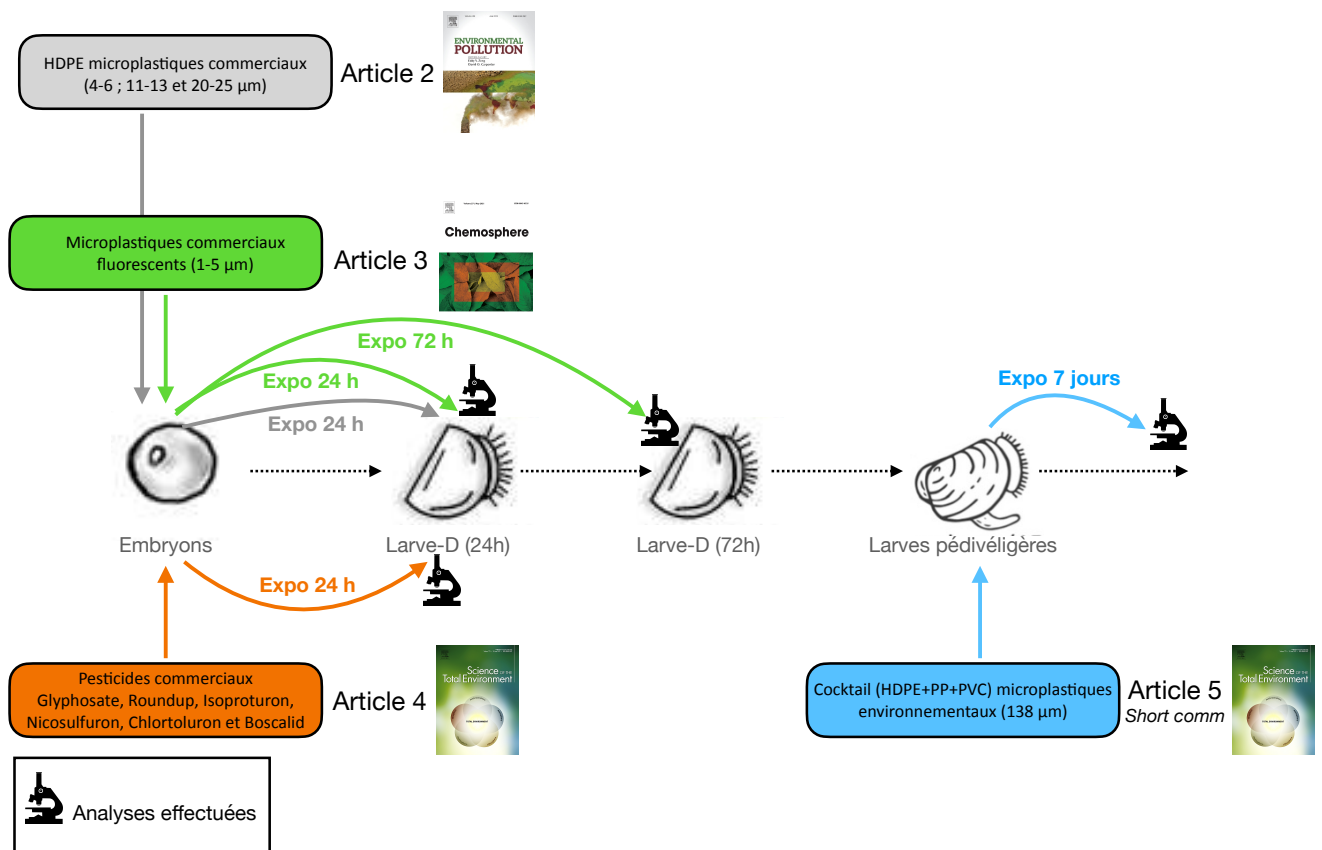


Figure 35. Schéma récapitulatif des travaux effectués sur les stades embryon-larvaire, larvaire et pédivéligère, exposés aux MP et pesticides.

Évaluer la toxicité des microplastiques commerciaux de polyéthylène (HDPE) de tailles différentes, de microplastiques fluorescents (ingestion) et microplastiques environnementaux ainsi que six substances pesticides (Glyphosate, Roundup, Isoproturon, Nicosulfuron, Chlortoluron et Boscalid) sur le stade embryon-larvaire (à 24 h), larvaire (à 72 h) et pédivéligère (à 17 jours) chez, *C. gigas*.

A. Article 2 : Effets des microplastiques commerciaux de différentes tailles de polyéthylène (HDPE) sur le développement et l'activité natatoire au stade embryon-larvaire de l'huître creuse (*C. gigas*)

Dans cet article, les effets de différentes tailles de microplastiques en polyéthylène (HDPE), ont été évalués sur le stade embryon-larvaire d'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Pour cela, trois tailles de MP commerciaux ont été sélectionnées : 4-6 ; 11-13 et 20-25 μm . Cette première étude a porté sur le polyéthylène haute-densité en raison de sa forte présence dans les recensements de déchets marins mais aussi du fait de son utilisation en tant que matériel professionnel ostréicole (poches de grossissement). Pour ce faire, des géniteurs matures d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*, ont été fournis par l'écloserie de France Naissain (Vendée, France) afin de réaliser des fécondations en conditions contrôlées de laboratoire. Par la suite, les embryons obtenus ont été exposés durant 24 h dans des microplaques à différentes concentrations de MP : 0 (control) ; 0,1 ; 1 et 10 mg.L^{-1} . Après 24 h de développement, les larves-D ont été analysées. Le comportement de nage a tout d'abord été enregistré (*i.e.* vitesses et trajectoires de nage) puis les larves ont été fixées grâce au Formol afin d'étudier les anomalies de développement et les arrêts de développement. Les premiers résultats nous montrent des effets significatifs pour les MP de 4-6 et 11-13 μm avec une augmentation des taux de malformations et des arrêts de développement. La vitesse de nage est significativement ralentie (effet dose-réponse) pour les plus petits MP (4-6 et 11-13 μm). De plus, on observe une augmentation des trajectoires « circulaires » et une diminution des trajectoires normales « rectilignes ». Ces contaminations plastiques pourraient, à plus long terme, impacter la survie, la faculté de prédation et la fixation larvaire.

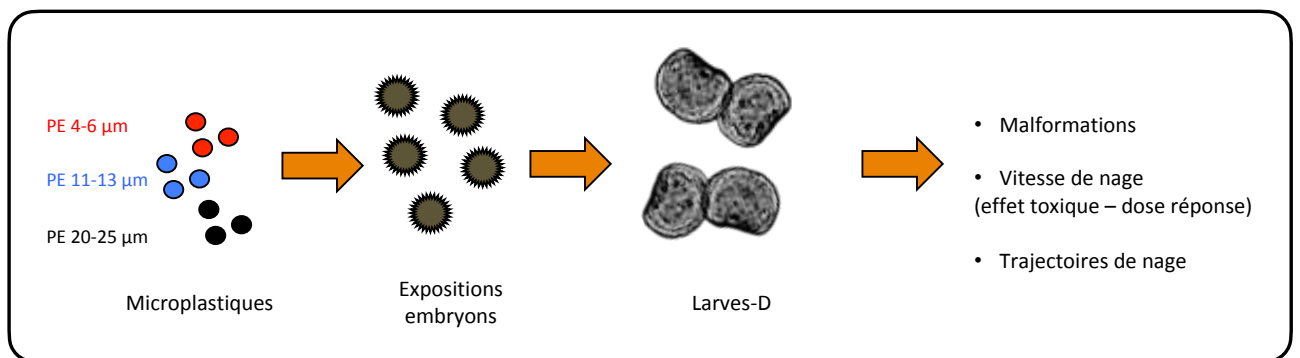


Figure 36. Schéma résumant les travaux réalisés dans le cadre de l'Article 2.



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol



High density polyethylene (HDPE) microplastics impair development and swimming activity of Pacific oyster D-larvae, *Crassostrea gigas*, depending on particle size[☆]



Arno Bringer^a, Hélène Thomas^a, Grégoire Prunier^a, Emmanuel Dubillot^a,
Noémie Bossut^a, Carine Churlaud^a, Christelle Clérandeau^b, Florane Le Bihanic^b,
Jérôme Cachot^{b,*}

^a Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266, CNRS - La Rochelle Université, 2 rue Olympe de Gouges, F-17042, La Rochelle Cedex 01, France

^b Université de Bordeaux, Laboratoire Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC), UMR CNRS 5805, F-33600, Pessac, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2019

Received in revised form

10 January 2020

Accepted 11 January 2020

Available online 15 January 2020

Keywords:

Polyethylene microplastics

Pacific oyster

Early life stage

Development

Swimming behaviour

ABSTRACT

Understanding the effects of plastic debris on marine ecosystems is essential in encouraging decision-makers to take action. The present study investigates the effect of a 24 h experimental exposure to high density polyethylene (HDPE) microplastics (MPs) of different sizes (4–6, 11–13 and 20–25 μm) and at three concentrations (0.1, 1 and 10 mg MPL^{-1}) on the development and locomotor activity of early stages of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. The bivalve embryo-larval assay (NF ISO 17244, 2015) was used in this study but with additional toxicity criteria: developmental arrests, abnormal D-larvae, maximum speed and swimming trajectory. Copper (Cu), was used as a positive control. Our results show that smaller MPs (4–6 and 11–13 μm) induced higher rates of malformations and developmental arrests than the larger ones (20–25 μm). In addition, a dose-dependent decrease of maximum swimming speed was observed for larvae exposed to MPs of 4–6 and 11–13 μm . On the other hand, there was no significant difference in swimming speed with the largest MPs size tested (20–25 μm). For all three sizes of MPs, there was a decrease in straight-line swimming trajectories, and an increase in circular trajectories. This abnormal swimming behaviour could affect larvae survival as well as colonization of new habitats.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Plastic debris pollution is on the increase, and has been identified as major emerging global problem affecting marine organisms and humans alike (Sutherland et al., 2016; Caruso, 2015; Wang et al., 2016).

In 2017, over 348 million tons of plastic were manufactured (PlasticsEurope, 2018). Eighty percent of plastic production in Europe is made up of 6 main polymers (PlasticsEurope, 2016): polypropylene (PP), HDPE and LDPE (high and low-density polyethylene), polyvinyl chloride (PVC), PUR (polyurethane), polyethylene terephthalate (PET) and polystyrene (PS). Jambeck et al. (2015) estimated that between 2 and 5% of these plastics are

discharged into oceans. In recent years, microplastics (MPs) have been increasingly in the public eye. MPs are defined as any forms of plastic particle between 1 μm and 5 mm size (Cole et al., 2011; Wagner et al., 2014), while nanoplastics are defined as any plastic less than 100 nm in length (Lambert and Wagner, 2016; Gigault et al., 2016). While micro and nanoplastics are often the result of fragmentation and degradation of larger volumes of plastic, they can also be released directly into the environment.

MPs are ubiquitous in marine water with reported concentrations ranging from 1 to 102,000 particles per m^3 (Van Cauwenberghe et al., 2015; Auta et al., 2017). PP and PE are the most common polymers in all environmental compartments (Isobe et al., 2014; Enders et al., 2015; Frere et al., 2017). These plastics persist in the environment due to their resistance to biodegradation (Yoshida et al., 2016) but also to chemical, photochemical and mechanical degradation (Cooper and Corcoran, 2010).

During the 2009 International Coastal Cleanup, a number of

[☆] This paper has been recommended for acceptance by Maria Cristina Fossi.

* Corresponding author.

E-mail address: jerome.cachot@u-bordeaux.fr (J. Cachot).

different types of marine debris were collected from coastlines and waterways around the world: cigarettes, bags, food wrappers, caps, beverage bottles, cups, plates, spoons, etc. (Kershaw et al., 2011). Recent publications have reported a high percentage (80%) of small MPs (25–50 µm) in surface water or sediment (particles for which few data are available), when compared with larger particles (Enders et al., 2015; Bergmann et al., 2017). The estimated concentration of MPs in surface seawater along European coastlines is 2.5 mg m⁻³ for sizes between 10 and 1000 µm (Paul-Pont et al., 2018).

Deleterious effects of MPs on feeding processes, behaviour, metabolism anomalies of holoplanktonic, meroplanktonic and benthic aquatic organisms have been reported for PS (Gerritsen and Porter, 1982; Holland et al., 1986; Ward and Targett, 1989; Solow and Gallager, 1990; Hart, 1991; Mayer, 1994; Ward, 1996; Baer et al., 2008). Only a few studies have focused on PE effects, particularly on blue mussel (*Mytilus sp.*) with effects on tissues and cells (Détrée and Gallardo-Escárate, 2017; Von Moos et al., 2012). Green, 2016 has shown that PE can influence the assembly of European oyster populations (*Ostrea edulis*). Au et al. (2015) observed that freshwater amphipods, *Hyalella azteca*, exposed to PE (fluorescent blue PE, 10–27 µm) showed growth and reproduction alterations after 10–42 days of exposure. Beiras et al. (2018) showed that exposure of zooplankton to PE (low-density PE, 1–500 µm) did not cause any significant toxic effects after 12 days of exposure. Cole and Galloway, 2015, observed the ingestion of MPs by the Pacific oyster larvae. In addition, a significant and linear increase in MPs uptake with increasing concentrations was observed at different larval stages of *Mytilus galloprovincialis* (Capolupo et al., 2018).

The present study focuses on the potential effects of PE for their high occurrence in the oceans. Indeed, the vast majority of equipment used by aquatic farmers is made of polymers, particularly PE. The French shellfish industry produced 216,917 tons of marketable shellfish during the 2015–2016 year (CNC, 2016), giving it one of the largest outputs in the world. Of that figure, the Poitou-Charente region was the most productive, accounting for 23% of the national total (CNC, 2016). It is therefore essential for better understanding the interaction of Pertuis Charentais' environment with oysters.

In addition to plastic pollution, coastal areas undergo several others anthropic pressures such as Copper (Cu) based fungicides widely used in viticulture to combat downy mildew in the Nouvelle-Aquitaine region (Singh, 2000), along with antifouling paint (Gatidou and Thomaidis, 2007). In this study, copper will serve as a positive control.

The objective of this paper is to study the embryo-larval development and swimming behaviour of D-larvae of oysters (*C. gigas*) in response to direct acute exposure to HDPE micro-particles of three different sizes without ingestion. Indeed, oyster embryos and larvae of less than 24 h old feed exclusively on their vitelline reserves and they cannot ingest particles.

2. Material and methods

2.1. Animal collection

Mature oysters (diploid male and female), *C. gigas* (Bayne et al., 2019; Bayne et al., 2017) came from a commercial hatchery specialized in production of mature oysters (France Naissain, France). Oysters were kept dry at 4 °C for two days to get better spawning outside the natural breeding season and then. Oysters were acclimatized in 18 °C filtered seawater 1 h before the beginning of experiments.

2.2. Chemicals and seawater

Seawater was collected from the Ile de Ré (SW France). After sampling, seawater was filtered using membrane filter of 20 µm, 5 µm, 1 µm and 0.2 µm to eliminate debris and microorganisms. Filtered seawater was stored at 4 °C with continuous bubbling and was used within 7 days. A few hours before the experiment, filtered seawater was filtered again at 0.2 µm. Water and sand samples were taken from the Atlantic coast.

Cu (CuSO₄) and formaldehyde were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St. Quentin Fallavier, France). Three sizes of PE MPs (HDPE) were used (4–6 µm MPP-635 XF, 11–13 µm MPP-635 G and 20–25 µm MPP-1241, density 0.96, Micropowders Inc. USA). Stock solutions of 100 µg.L⁻¹ for Cu and 100 mg MP.L⁻¹ for MPs were prepared in pure Milli-Q-water (Milipore) for Cu and in filtered seawater for MPs. Working solutions were obtained by diluting the stock solutions in filtered seawater and conserve at 4 °C and in the dark for MPs. Before each exposure, working solutions were centrifuged at low speed for 2 min. Three concentrations of exposure were selected according to previous work for Cu: 0.1, 1 and 10 µg.L⁻¹ and for MPs: 0.1, 1 and 10 mg.L⁻¹ (Beiras et al., 2018). The selected concentrations in MPs are higher than what can be found in the environment. For Cu, the range of experimental concentrations was chosen based on preliminary studies (Mai et al., 2012) in order to get a complete dose-response curve.

2.3. Exposure solutions analysis

For quantitative analysis of PE MPs at different concentrations (0.1, 1 and 10 mg MP.L⁻¹), each solution was tested in a flow cytometer (Attune Acoustic Focusing Cytometer). Two-millilitres samples were prepared from the MP solution used for embryo-larval exposures (n = 4/condition). The samples were vortexed (StarLab Vortex IR, 12,000 rpm for 20 s) before being transferred into the cytometer to homogenize the solution. 300 µL were taken for flow cytometry analysis. Calibration was performed to obtain an analysis rate of 500 µL min⁻¹ and a saturation of 10,000 particles maximum detected. Control analytical samples (n = 12) were made of filtered seawater (without the presence of MPs) to obtain a blank and remove background if necessary (particles naturally present in the water).

Chemical analyses of Cu were carried out in sandy sediments (surface and semi-depth 5 cm) and in coastal seawater close to shellfish areas. This gave us an indication of the environmental concentrations found. The water was acidified to 5% and then analysed and diluted to one-third. For the sediment, 200 mg was weighed and then acidified with 6 mL of nitric acid and 2 mL of hydrochloric acid. The sediment was then mineralized by microwave (rise in temperature at 120 °C and then plateau at 120 °C for 30 min, then cooling to room temperature). The resulting mineralization was topped up to 50 mL with ultra-pure water. The prepared samples were then assayed by ICPMS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Thermofisher, X, Model II). The limit of quantification was equivalent to 0.02 µg.L⁻¹.

2.4. Experimental design

Mature oysters were cleaned to avoid any external contaminations and remove the microorganisms attached to them. Male and female oysters were induced to spawn by thermal stimulation (alternating immersion in filtered seawater of 18 °C and 28 °C for 30 min) or by stripping the gonad where thermal stimulation was ineffective (Mai et al., 2013; Gamain et al., 2017). Spawning males

and females were individually isolated in beakers (500 mL of filtered seawater) at their respective spawning temperatures (Parker et al., 2009). Individuals were left undisturbed for 10 min and 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 (Sefar Nitex), respectively to eliminate debris and faeces. Sperm mobility was verified and the number of eggs was counted under stereomicroscope (Nikon) at a magnification of 100.

Eggs were fertilized with sperm in ratio of 1:10 (egg:sperm). Fertilization success was verified under a microscope, and embryos were then counted and transferred to a 24-well microplate (Greiner Bio-One, Cellstar) for embryotoxicity assays following previously published protocols (His et al., 1997; Quiniou et al., 2005; NF ISO 17244, 2015). MP solutions were resuspended before injecting them into the microplates. Fertilized eggs (around 350 eggs/well) were exposed in wells containing 2 mL of toxicant solution and were incubated in the climatic chamber during 24 h at 24 °C in the dark to obtain an optimized development (Robinson, 1992).

2.5. Swimming activity

After 24 h (e.g. 1 dpf, day post fertilization) of incubation, the swimming behaviour was recorded under a microscope (ZEISS Axio Observer Z1) with a magnification of 100 in natural light condition and in air conditioned-room at 24 °C. Two-minute videos were recorded (2 or 3 videos per condition, and per replicate). In this experiment, a replicate corresponds to a pair of oysters (couple) having obtained fertilization success. Three different couples were used and four analytical replicates were performed for each

condition. The experimental design presented above is shown schematically in Fig. 1.

A freeware application (VirtualDub, Windows) for video conversion was used to subsample films to 4fps and convert them to AVI format (Gamain et al., 2019). ImageJ (1,52a software) was used to analyse different videos. Videos (AVI format) were converted to grayscale image (Fig. 2a), then converted into a binary stack of images (Fig. 2b). Swimming parameters (Fig. 2d) of each individual D-larvae numbered as maximum speed (pixel/s) and swimming trajectories were calculated using the wrMTrck plugin (Fig. 2d). As a result, each tracked larva was assigned a number, with each number used to identify the tracked larvae in the results file (Fig. 1). We identified three different types of larval path: (1) rectilinear; (2) circular and (3) motionless following protocol published by Gamain et al. (2019) with improvements (Table 1). The use of a graphic tablet (Wacom Bamboo Pen&Touch) and image processing software (Photos, Windows 10) allowed swimming trajectories to be quantified and characterised. In this study, we used a single condition (control) without contaminant for trajectory analysis. Once the videos were processed with the plugin, we take back video analysis to ensure that the same larvae were not detected more than once.

2.6. Developmental abnormalities

After video recording, 25 µL of 1% buffered formalin were added to each well, and the percentage of abnormal oyster larvae (Fig. 2e) and developmental arrest were recorded (His et al., 1999; Quiniou et al., 2005). Abnormal larvae and developmental arrest were directly observed on an inverted microscope (Nikon eclipse). An

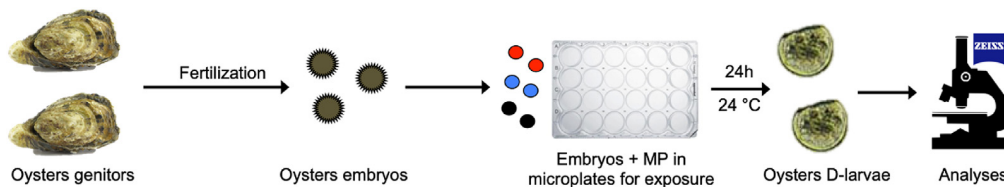


Fig. 1. Experimental design. After a 24 h-exposure to Cu or MPs, oyster D-larvae malformations and swimming behaviour were analysed. A 2 min-video was recorded for each batch of larvae and then abnormal D-larvae were quantified after formaldehyde fixation.

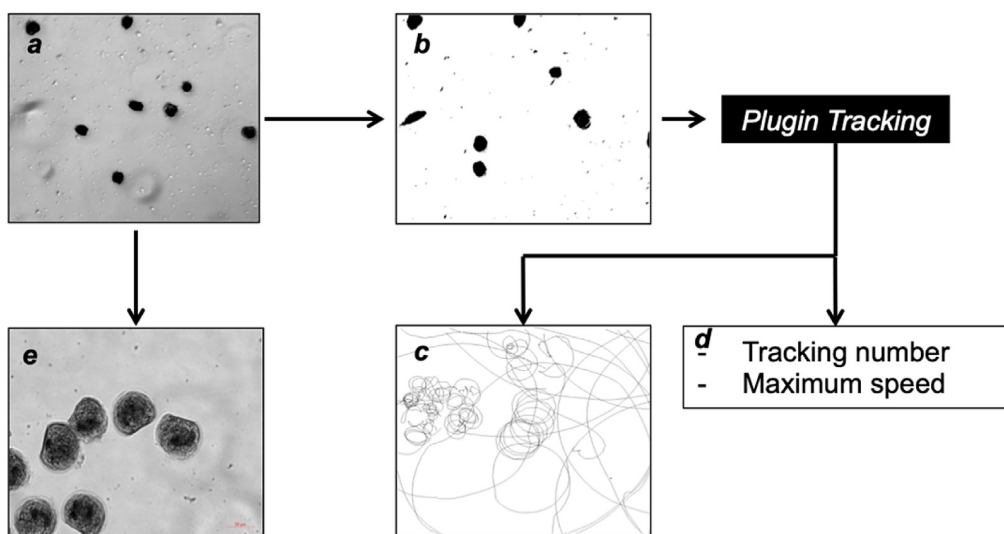
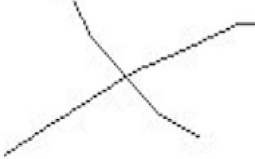
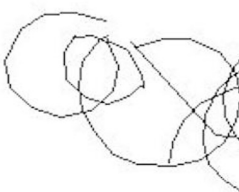



Fig. 2. Procedure for swimming behaviour analysis of oyster D-larvae. (a) Original image after conversion. (b) Binary image. (c) Traces of larval path. (d) Parameters studied. (e) Quantification of abnormal D-larvae and developmental arrest after fixation with formaldehyde (1%).

Table 1
Paths analysis of oyster D-larvae with three categories of trajectories: rectilinear, circular and motionless.

Rectilinear	Circular	Motionless
Straight or lightly curved lines + paths without any patterns	Large circles + paths with a repeating pattern or loops	Small circles + Large Points
		

important prerequisite for this test is the presence, in control condition of less than 20% of abnormal larvae (Quiniou et al., 2005). Three different couples were used and four replicates were performed for each condition.

2.7. Statistics

All data are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). If data did not follow a normal distribution, it was transformed using the formula: $P' = \arcsin \sqrt{r}$; P corresponds to 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 Kruskal-Wallis test. Differences between tested concentrations means were then performed using Kruskal Nemenyi Post-hoc test (equivalent to the Tukey test for non-parametric data). Significance difference was accepted when p-value < 0.05 . Statistical analysis was conducted using R, and graphs prepared using Microsoft Excel.

3. Results

3.1. Effects of different sizes of polyethylene microplastics on embryo-larval development

Different abnormalities (abnormal shell, convex shell, scalloped

shell, incomplete shell and mantle abnormality) observed in oyster D-larvae (Mottier et al., 2013) were recorded after 24 h exposure to copper (Fig. 3a) and PE MPs (Fig. 3b and c). Abnormal larvae and developmental arrest average frequencies were respectively $12.8 \pm 1.3\%$ and $4.6 \pm 0.5\%$ for control conditions (Fig. 4 and supplementary data, Table S1). The percentage of developmental arrest was significant from $0.1 \mu\text{g Cu.L}^{-1}$ ($12.9 \pm 2.5\%$) and increased to $37.8 \pm 9.7\%$ (Fig. 4, a and supplementary data Table S1). For the exposure to different sizes of PE MPs, the number of malformed oyster D-larvae increased significantly from the lowest PE MPs concentration (0.1 mg MPL^{-1}) for the 4–6 μm (Fig. 4b) and 11–13 μm particle sizes (Fig. 4c). The percentage of developmental arrest showed a dose-dependent increase for the 11–13 μm PE MPs (Fig. 4c) with a maximum effect at the highest tested concentration ($17.7 \pm 0.7\%$ at 10 mg MPL^{-1}). For the larger MPs (20–25 μm), significantly different malformation rates were observed from the highest concentration at 10 mg MPL^{-1} ($16.3 \pm 1.5\%$, Fig. 4d). There are no significant differences in developmental arrest with embryo-larval exposure to MP 20–25 μm (Fig. 4d).

3.2. Effects of different sizes of polyethylene microplastics on D-larvae swimming activity

In control condition (filtered seawater), the average speed of oyster D-larvae was $109 \pm 3 \mu\text{m s}^{-1}$ and the maximum speed was

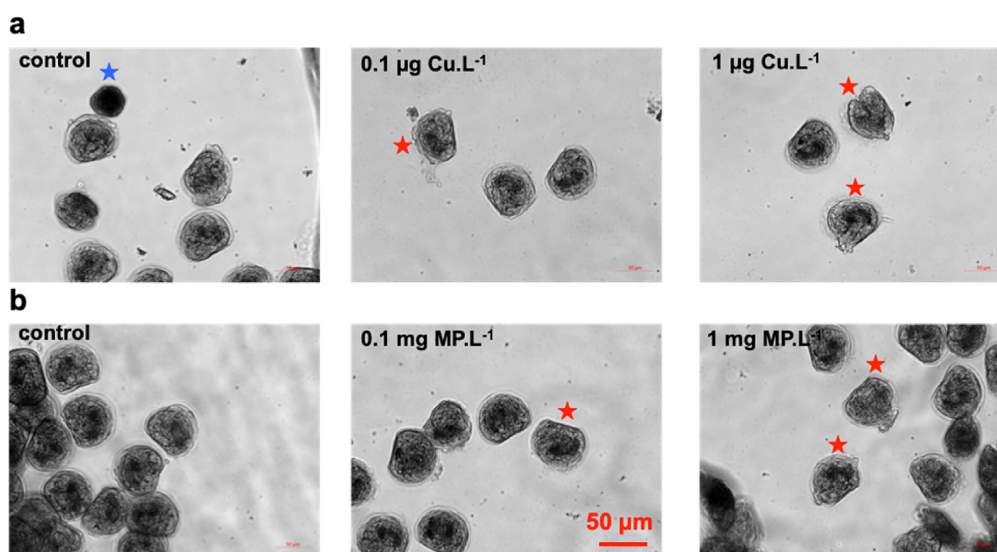


Fig. 3. Photographs of normal, abnormal D-larvae (red star) of *C. gigas* and developmental arrest (blue star) after 24 h of exposure to 0.1 and $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ of Cu (a) or to 0.1 and 1 mg.L^{-1} of PE MPs 4–6 μm (b). ZEISS Axio Observer Z1 photographs (x20). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

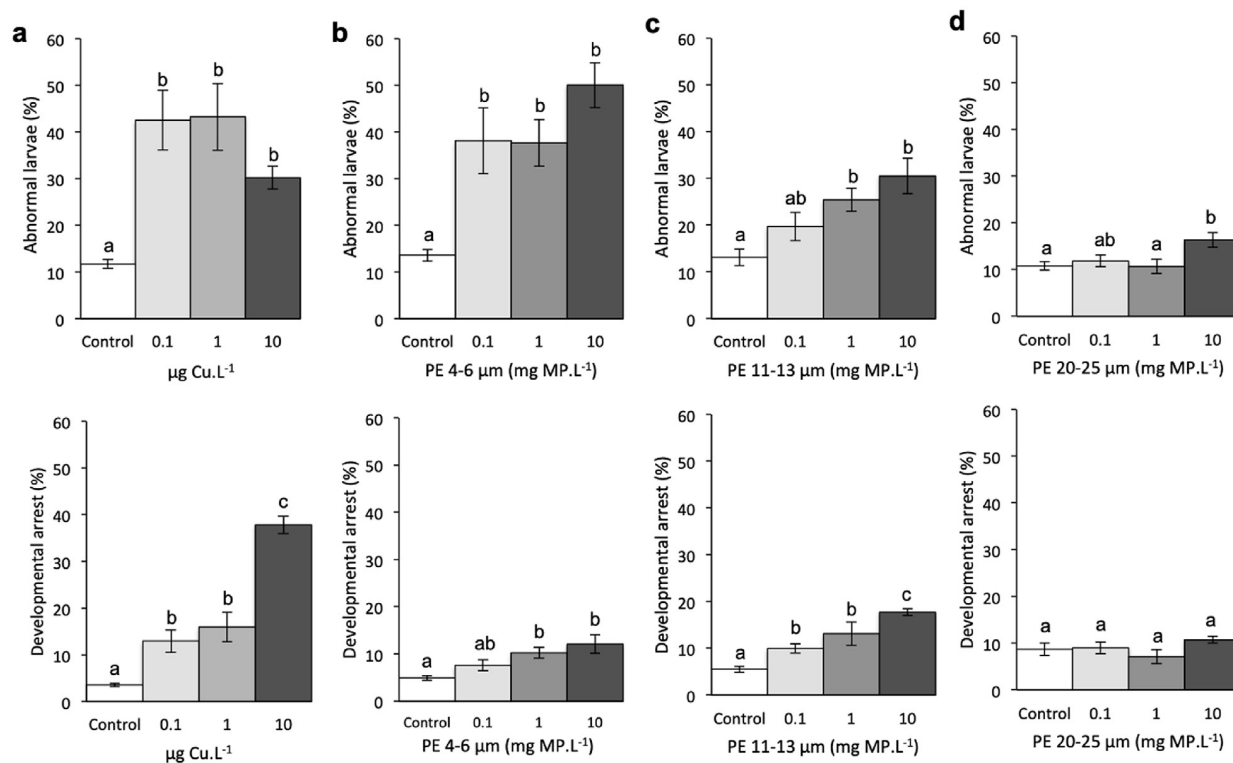


Fig. 4. Abnormal larvae (%) vs. concentrations (Mean \pm SEM) of oyster D-larvae of *C. gigas* (above) and developmental arrest (%) vs. concentrations (bottom) following 24 h embryonic exposure to different concentrations of Cu (a) and PE MPs of 4–6 μm (b), 11–13 μm (c) and 20–25 μm size (d). Control (without pollutants): 0.1, 1 and 10 correspond to concentrations of Cu ($\mu\text{g Cu.L}^{-1}$) and PE MPs using for exposures (mg MP.L^{-1}). Values are mean \pm SEM for three replicates. Different letters indicated significant differences between different concentrations ($p < 0.05$).

191 \pm 7 $\mu\text{m s}^{-1}$ (supplementary data, Table S2) while 66.4 \pm 13.7% of the D-larvae swam following a rectilinear trajectory and 27.3 \pm 16.0% shown circular paths (Fig. 6). Motionless larvae were rare within the control group with 6.4 \pm 11.1% (Fig. 5). After 1 $\mu\text{g Cu.L}^{-1}$ exposure, the maximum speed significantly decreased compared to control and the percentage of circular and motionless trajectories increased significantly, whereas rectilinear trajectory declined (Fig. 5a). After exposure to MP 4–6 μm , a decrease in maximum recorded swimming speeds was observed for the concentrations at 0.1 and 1 mg MP.L^{-1} (with respectively 151 \pm 5 and 119 \pm 6 $\mu\text{m s}^{-1}$, Fig. 5b). We also observed a strong increase in circular trajectories for MP-exposed larvae, with 49.9 \pm 22.0% at 0.1 mg MP.L^{-1} and 69.8 \pm 15.6% at 10 mg MP.L^{-1} condition (Fig. 5b). For 11–13 μm MP, the same trend can be seen with a significant decrease in maximum swimming speed. Effectively, at 0.1 and 1 mg MP.L^{-1} we find respectively 192 \pm 8 and 155 \pm 6 $\mu\text{m s}^{-1}$ (Fig. 5c). At concentrations 0.1 and 1 mg MP.L^{-1} , there is a significant increase in circular trajectories (with respectively 51.4 \pm 8.1 and 65.1 \pm 13.1%, Fig. 5c). While the straight paths decrease significantly for all 11–13 μm MP concentrations. Motionless trajectories, on the other hand, increase with concentrations in MP. However, there were no significant differences in maximum speed recorded of D-larvae exposed to MP 20–25 μm (Fig. 5d). The D-larvae trajectories show an increase in “circular” and a reduction in straight-line paths (Fig. 5d).

3.3. Exposure solution analysis

Concentrations of the different sizes of HDPE MPs were measured using flow cytometry in the filtered seawater working solutions, (Table 2). For 4–6 μm MPs we found dilution factors of

8.7 and 9.3. These calculated dilution factors are consistent with theoretical concentrations. For 11–13 μm MPs, the first dilution factor was 3 for 0.1 mg MP.L^{-1} , which is quite low compared to the theoretical dilution factor of 10. For 20–25 μm MPs, the dilution factors of 6 and 6.8 are in adequacy with the theoretical concentrations of exposures.

4. Discussion

The present study is the first to focus on swimming behaviour of oyster larvae (*C. gigas*) exposed to HDPE MPs. It is an experimental integrative approach, designed to complement the previously published results on the effects of PS MPs on oyster embryos and larvae (Tallec et al., 2018; Cole and Galloway, 2015; Sussarellu et al., 2016).

Through this study, the main objective is to evaluate the impact of MPs exposure (HDPE spherical particles) on the development and swimming activity of oyster embryos and larvae (early stages of development). It is important to understand that our swimming analyses consider two-dimensional rather than three-dimensional movements (Gamain et al., 2019). A potential way of improving this in the future will be to capture behaviour in three dimensions, thus covering the whole water column.

A flow cytometry verification was set up to determine actual concentrations of MP particles in the exposure media. Long et al. (2017), had also determined MP concentrations through flow cytometry. Apart from the concentration at 1 mg MP.L^{-1} for PE 11–13 μm , the other concentrations seem consistent to the expected theoretical concentrations. The concentrations used in this study are high compared to what is currently found in the marine environment (Van Cauwenberghé et al., 2015; Auta et al., 2017).

CHAPITRE IV – Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryo-larvaire et pédiveligère chez l'huître creuse (*C. gigas*)

6

A. Bringer et al. / Environmental Pollution 260 (2020) 113978

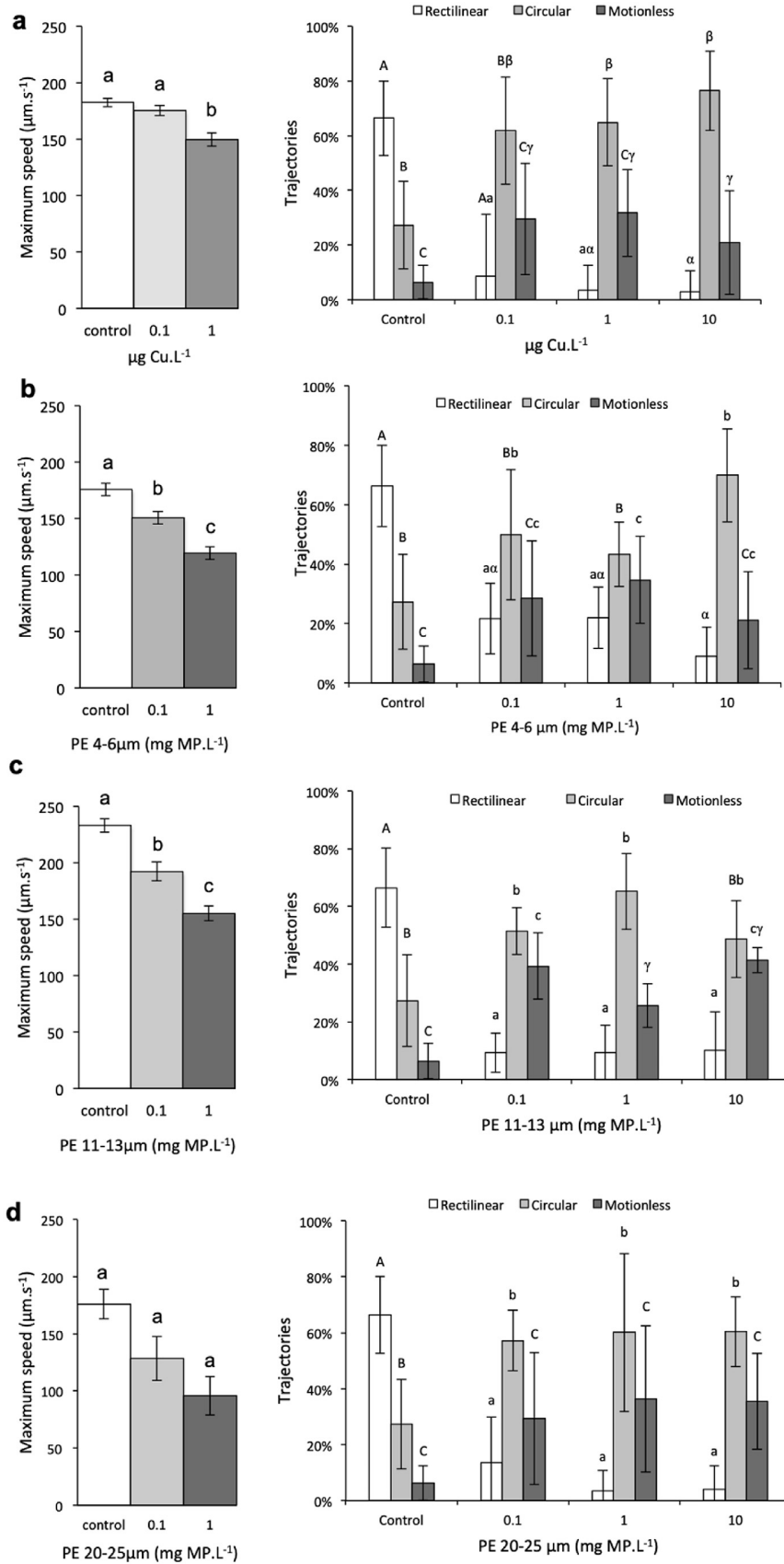


Fig. 5. Maximum speed and trajectories of D-larvae of *C. gigas* following 24 h embryonic exposure to different concentrations of Cu (a) and PE MPs of 4–6 µm (b), 11–13 µm (c) and 20–25 µm (d). Control (without pollutants): 0.1, 1 and 10 correspond to concentrations of Cu (µg Cu.L⁻¹) or PE MPs (mg MP.L⁻¹) used for exposures. Values are mean ± SEM for three replicates. Different letters indicated significant differences between different concentrations ($p < 0.05$).

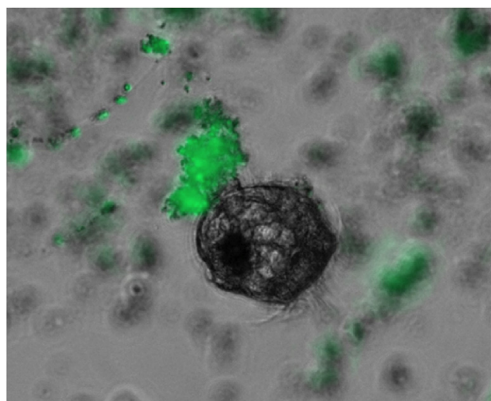


Fig. 6. D-larva with MPs stuck in her locomotor eyelashes. Screenshot from a video recorded with the ZEISS Axio Observer Z1 microscope (x20). In order to observe MP behaviour, we used fluorescent microbeads (1–5 μm , Cospheric).

In filtered seawater, oyster D-larvae adopted mainly a straight-line trajectory as already reported by Gamain et al. (2019) for the same species. Circular and motionless trajectories are considered as an abnormal swimming behaviour of D-larvae (His et al., 1999; Gamain et al., 2019). The average swimming speed recorded for this study was $100 \mu\text{m s}^{-1}$ lower than this recorded by Gamain et al. (2019). These differences of behaviour could be explained by the fact that fertilization was carried out during the spawning period (June–August) whereas in our study, the fertilizations were realized during the October–November period. The temperature when recording videos plays also an important role and was maintained during our experimentation to 24°C .

For all controls, abnormal D-larvae was below 20% and the mean rate was $12.8 \pm 1.3\%$. Exposure to Cu induced a significant increase of abnormal D-larvae from the first concentration tested e.g. $0.1 \mu\text{g Cu.L}^{-1}$ which is above the current water concentration of Cu $0.06 \mu\text{g Cu.L}^{-1}$ detected in the coastal waters of Pertuis Charentais in 2019. Regarding development arrests, a significant increase was observed from $0.1 \mu\text{g Cu.L}^{-1}$. These results are higher than in the paper of Gamain et al. (2016) for the same copper concentrations but is in adequacy with Gamain et al. (2019).

Greater toxicity of smaller plastic particles were reported by Tallec et al. (2018) for PS nanoplastics (500 and 50 nm) compared to PS MPs (2 μm) on fertilization success and embryo-larval development of oyster *C. gigas*. With the same tested concentrations of PE particles, we observed a significant increase of developmental anomalies. From the results of our study, we can conclude that the smaller the HDPE MPs are, the more deformities and developmental arrests are visible on the oyster larvae. Different impacts on D-larvae have been reported following the exposure of spawners. A decrease in size and growth of oyster larvae were reported following exposure to PS MPs (Sussarellu et al., 2016). Spherical

particles are the most commonly used in laboratory studies, but fibers and fragments are the most common forms detected in wild organisms (de Sá et al., 2018). Mesaric et al. (2015) investigated acute toxicity and performed swimming tests on *Artemia salina* larvae with MP concentrations between 0.01 and 1 mg.L^{-1} . They reported that nanomaterials can bind on external surfaces of *A. salina* larvae and affect their swimming activity. In addition to testing the effect of PE MPs on the early stages of *C. gigas*, copper exposures were performed in order to have a positive control (MacInnes and Calabrese, 1979; Wang et al., 2011; Mai et al., 2012; Gamain et al., 2017; Sussarellu et al., 2018).

With respect to swimming behaviour (recording of maximum speed), larvae for control conditions (1 dpf) had a maximum swimming speed between 160 and $182 \mu\text{m s}^{-1}$. Larvae exposed to the Pertuis Charentais environmental concentration had no altered swimming speed. A decrease in swimming speed was observed from $1 \mu\text{g Cu.L}^{-1}$. Contrary to this result, Gamain et al. (2019) did not observe any effects on swimming behaviour at any of these Cu concentrations.

In our MPs exposure conditions (24°C , salinity of 33 usi, in the dark), the average speed and maximum swimming speed recorded for oyster larvae are respectively $109 \mu\text{m s}^{-1}$ and $192 \mu\text{m s}^{-1}$ for control condition (without MPs). According to Suquet et al. (2012), the average speed recorded for oyster larvae without contamination was $105 \mu\text{m s}^{-1}$. The results would seem rather similar, despite the fact that they used a development temperature of 19°C , whereas ours was 24°C . In comparison with Gamain et al. (2019), which found swimming values much higher at 144 and $297 \mu\text{m s}^{-1}$ for average speed and maximum swimming speed, respectively. The differences in values could be explained by the quality of the parents but also the period of the year and the day when the videos are recorded. We also kept the optimal temperature of development during the video recording which may be the cause of the differences in swimming speed between these two studies.

For the small (4–6 μm) and medium size (11–13 μm) of PE particles, a dose-dependent decrease in swimming speed was observed, while for the larger ones (20–25 μm), no effect was reported. Lee et al. (2013) tested three different sizes of PS MPs (0.05, 0.5 and 6 μm in diameter) on the marine copepod, *Tigriopus japonicus* in a two-generation chronic toxicity test. Their results highlighted that nanoplastics (0.05 μm and 0.5 μm) but not microplastics (6 μm) affect the survival of nauplii and copepodites in the F0 and F1 generations.

The analysis of the trajectories taken by the larvae during their displacements shows, for all the tested MPs, a decrease in straight-line trajectories and an increase in circular trajectories. This alteration of swimming behaviour could lead to behavioral differences in larvae's ability to predate but especially in their ability to react to a predator. It seems that the smaller the plastics, the more the effects are noticeable on swimming behaviour but also on developmental anomalies. This is comparable to the results of Tallec et al.

Table 2
Theoretical and measured MPs concentrations (mean \pm SEM) in the working solutions at the beginning of the embryotoxicity test.

Conditions	Theoretical (mg.L^{-1})	Measured ($\text{MP}.\mu\text{L}^{-1}$)	Measured ($\text{MP}.\text{mL}^{-1}$)	Dilution factor
MP 4–6 μm	0.1	0.3 ± 0.0	300	–
	1	2.6 ± 0.1	2600	8.7
	10	24.1 ± 0.7	24,100	9.3
MP 11–13 μm	0.1	0.3 ± 0.0	300	–
	1	0.9 ± 0.0	900	3
	10	16.1 ± 0.1	16,100	17.9
MP 20–25 μm	0.1	0.2 ± 0.0	200	–
	1	1.2 ± 0.0	1200	6
	10	8.2 ± 0.2	8200	6.8

(2018), where nanoplastics had more effects on larval development than coarser MPs.

There may also be effects on the survival, fitness, dispersion of larvae and colonization of new habitats (Gamain et al., 2019). The observed effects of early embryo-larval exposure to MPs in oysters could also affect the following developmental stages (pediveliger, spat and adults). Indeed, a recent publication shows that blue mussels, *Mytilus edulis*, have difficulties attaching to their substrate when in the presence of MPs (Green et al., 2019). More recently, Yin et al. (2019), have shown that black rockfish, *Sebastes schlegelii*, exposed to 0.19 mg.L⁻¹ PS MPs of 15 µm, had drastic reduction in their swimming speeds as well as reduction of range of movements, which may affect hunting behaviour and exploration competence.

The impact of HDPE MPs on swimming behaviour could be explained by interactions of these particles with larval cilia (Fig. 6). Beiras et al. (2018) reported that HDPE particles (4–6 µm) can stuck on villi of the chorion of *Oryzias melastigma* embryos. Agglomerates of MPs tend to settle and stick along the mantle of organisms, as with nanoplastics on the antennules and abdomen of the brine shrimp *A. franciscana* (Bergami et al., 2016). Nanosized latex particles (39.4 nm) have shown to adsorb on the fertilized egg surface of Japanese medaka, *Oryzias latipes* (Kashiwada, 2006). Like Medaka egg chorions, oyster D-larvae have cilia to move in the water column. This would explain the fact that D-larvae exposed to HDPE MPs exhibited altered swimming behaviour.

Altogether, these results support the hypothesis that the smallest MPs at high concentrations can trigger deleterious effects on early life stage of Pacific oyster over short-term exposure. Future studies are needed to verify whether LDPE MPs have similar effects on D-larvae and investigate the impacts of ingestion of nanometer-sized PE particles on D-larvae. It would also be particularly relevant to evaluate the long-term effects of chronic exposure to environmental concentrations of MPs.

5. Conclusions

In conclusion, our experimental results highlight that small (4–6 µm) and medium sizes (11–13 µm) HDPE particles at high concentrations are toxic for *C. gigas* early life stage. However, in comparison to the effects of Cu, the toxicity of HDPE MPs is much lower. Our data suggest that small HDPE particles (4–6 µm) are the most toxic to the embryo-larval development of oyster. HDPE of 20–25 µm had very little effect on development anomalies and developmental arrest. With regard to swimming behaviour, D-larvae of *C. gigas* are more sensitive to HDPE particles <15 µm. Further research on early life stages of bivalves and other invertebrates, is crucial in strengthening the knowledge base required to establish recommendations and potential long-term effects of using plastics in coastal areas and estuaries.

CRedit authorship contribution statement

Arno Bringer: Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Hélène Thomas:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing, Funding acquisition. **Grégoire Prunier:** Investigation. **Emmanuel Dubillot:** Investigation. **Noémie Bossut:** Investigation. **Carine Churlaud:** Investigation. **Christelle Clérandeau:** Investigation. **Florane Le Bihanic:** Investigation, Methodology. **Jérôme Cachot:** Conceptualization, Methodology, Validation, Writing - review & editing, Supervision.

Acknowledgements

A. Bringer was recipient of a PhD grant (Comité Régional de la

Conchyliculture de la Charente Maritime, CRC17) and for financial support by Région Nouvelle Aquitaine and Comité Départemental de la Charente Maritime (CD17) to develop this research. This work was supported by grants from the AQUAECO (Amélioration de la QUALITÉ Environnementale sur les zones CONchylicoles des Pertuis Charentais) project funded by partnership CRC17, AFB (Agence Française de la Biodiversité, Parc naturel marin de l'estuaire de la Gironde et de la mer des Pertuis). Funding was also supported in part by the La Rochelle University, the University of Bordeaux, the Centre National de la Recherche Scientifique (France). The authors greatly thank France Naissain for providing the oysters genitors specimens & James Emery for its kind contribution to English review of the manuscript. We thanks' all collaborators for their works and their help during this study.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113978>.

References

- Au, S.Y., Bruce, T.F., Bridges, W.C., Klaine, S.J., 2015. Responses of *Hyalella azteca* to acute and chronic microplastic exposures. *Environ. Toxicol. Chem.* 34 (11), 2564–2572.
- Auta, H.S., Emenike, C.U., Fauziah, S.H., 2017. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment international*, 102, 165–176.
- Baer, A., Langdon, C., Mills, S., Schulz, C., Hamre, K., 2008. Particle size preference, gut filling and evacuation rates of the rotifer *Brachionus* "Cayman" using polystyrene latex beads. *Aquaculture* 282 (1–4), 75–82.
- Bayne, B.L., Ahrens, M., Allen, S.K., D'auriac, M.A., Bacheljau, T., Beninger, P., Bohn, R., Boudry, P., Davis, J., Green, T., Guo, X., Hedgecock, D., Ibarra, A., Kingsley-Smith, P., Krause, M., Langdon, C., Lapéque, S., Li, C., Manahan, D., Mann, R., Perez-Paralle, L., Powell, E.N., Rawson, P.D., Speiser, D., Sanchez, J.-L., Shumway, S., Wang, H., 2017. The proposed dropping of the genus *Crasostrea* for all pacific cupped oysters and its replacement by a new genus *Magallana*: a dissenting view. *J. Shellfish Res.* 36 (3), 545–548.
- Bayne, B., d'Auriac, M.A., Bacheljau, T., Beninger, P., Boudry, P., Carnegie, R., Langdon, C., 2019. A scientific name for Pacific oysters. *Aquaculture* 499, 373.
- Beiras, R., Bellas, J., Cachot, J., Cormier, B., Coussin, X., Engwall, M., Gambardella, C., Garaventa, F., Keiter, S., Le Bihanic, F., Lopez-Ibanez, S., Piazza, V., Rial, D., Tato, T., Vidal-Linan, L., 2018. Ingestion and contact with polyethylene microplastics does not cause acute toxicity on marine zooplankton. *J. Hazard Mater.* 360, 452e460.
- Bergami, E., Bocci, E., Vannuccini, M.L., Monopoli, M., Salvati, A., Dawson, K.A., Corsi, I., 2016. Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp *Artemia franciscana* larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 123, 18–25.
- Bergmann, M., Wirzberger, V., Krumpfen, T., Lorenz, C., Primpke, S., Tekman, M.B., Gerdts, G., 2017. High quantities of microplastic in Arctic deep-sea sediments from the Hausgarten observatory. *Environ. Sci. Technol.* 51 (19), 11000–11010.
- Capolupo, M., Franzellitti, S., Valbonesi, P., Lanzas, C.S., Fabbri, E., 2018. Uptake and transcriptional effects of polystyrene microplastics in larval stages of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Pollut.* 241, 1038–1047.
- Caruso, G., 2015. Plastic degrading microorganisms as a tool for bioremediation of plastic contamination in aquatic environments. *Pollut. Eff. Contr.* 3, e112.
- CNC (Comité National de la Conchyliculture), 2016. <http://www.cnc-france.com/La-Production-francaise.aspx> (accessed August 2019).
- Cole, M., Galloway, T.S., 2015. Ingestion of nanoplastics and microplastics by Pacific oyster larvae. *Environ. Sci. Technol.* 49 (24), 14625–14632.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2588–2597.
- Cooper, D.A., Corcoran, P.L., 2010. Effects of mechanical and chemical processes on the degradation of plastic beach debris on the island of Kauai, Hawaii. *Mar. Pollut. Bull.* 60(5), 650–654.
- de Sá, L.C., Oliveira, M., Ribeiro, F., Rocha, T.L., Futter, M.N., 2018. Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: what do we know and where should we focus our efforts in the future? *Sci. Total Environ.* 645, 1029–1039.
- Détrée, C., Gallardo-Escárate, C., 2017. Polyethylene microbeads induce transcriptional responses with tissue-dependent patterns in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *J. Molluscan Stud.* 83 (2), 220–225.
- Enders, K., Lenz, R., Stedmon, C.A., Nielsen, T.G., 2015. Abundance, size and polymer composition of marine microplastics ≥ 10 µm in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. *Mar. Pollut. Bull.* 100 (1), 70–81.
- Frere, L., Paul-Pont, I., Rinnert, E., Petton, S., Jaffre, J., Bihannic, I., Soudant, P., Lambert, C., Huvet, A., 2017. Influence of environmental and anthropogenic factors on the composition, concentration and spatial distribution of microplastics: a case study of the Bay of Brest (Brittany, France). *Environ. Pollut.* 225,

CHAPITRE IV – Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryo-larvaire et pédivéligère chez l'huître creuse (*C. gigas*)

A. Bringer et al. / *Environmental Pollution* 260 (2020) 113978

9

- 211–222.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Pardon, P., Tapie, N., Gourves, P.Y., Budzinski, H., Morin, B., 2016. Combined effects of pollutants and salinity on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 113, 31–38.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Clérandeau, C., Mazzella, N., Gourves, P.Y., Morin, B., 2017. Combined effects of temperature and copper and S-metolachlor on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Pollut. Bull.* 115 (1–2), 201–210.
- Gamain, P., Roméro-Ramirez, A., Gonzalez, P., Mazzella, N., Gourves, P.Y., Compan, C., Morin, B., Cachot, J., 2019. Assessment of swimming behavior of the Pacific oyster D-larvae (*Crassostrea gigas*) following exposure to model pollutants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04156-8>.
- Gatidou, G., Thomaidis, N.S., 2007. Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. *Aquat. Toxicol.* 85 (3), 184–191.
- Gerritsen, J., Porter, K.G., 1982. The role of surface chemistry in filter feeding by zooplankton. *Science* 216 (4551), 1225–1227.
- Gigault, J., Pedrono, B., Maxit, B., Ter Halle, A., 2016. Marine plastic litter: the unanalyzed nano-fraction. *Environ. Sci.: Nano* 3 (2), 346–350.
- Green, D.S., 2016. Effects of microplastics on European flat oysters, *Ostrea edulis* and their associated benthic communities. *Environ. Pollut.* 216, 95–103.
- Green, D.S., Colgan, T.J., Thompson, R.C., Carolan, J.C., 2019. Exposure to microplastics reduces attachment strength and alters the haemolymph proteome of blue mussels (*Mytilus edulis*). *Environ. Pollut.* 246, 423–434.
- Hart, M.W., 1991. Particle captures and the method of suspension feeding by echinoderm larvae. *Biol. Bull.* 180 (1), 12–27.
- His, E., Seaman, M.N.L., Beiras, R., 1997. A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Res.* 31 (2), 351–355.
- 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 (7), 1706–1718.
- Holland, N.D., Strickler, J.R., Leonard, A.B., 1986. Particle interception, transport and rejection by the feather star *Oligometra serripinna* (Echinodermata: crinoidea), studied by frame analysis of videotapes. *Mar. Biol.* 93 (1), 111–126.
- Isobe, A., Kubo, K., Tamura, Y., Nakashima, E., Fujii, N., 2014. Selective transport of microplastics and mesoplastics by drifting in coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 89 (1–2), 324–330.
- Jambeck, J., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A.L., Narayan, R., Law, K.L., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* 347, 768–771.
- Kashiwada, S., 2006. Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Health Perspect.* 114 (11), 1697–1702.
- Kershaw, P., Katsuhiko, S., Lee, S., Woodring, D., 2011. Plastic Debris in the Ocean. United Nations Environment Programme.
- Lambert, S., Wagner, M., 2016. Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene. *Chemosphere* 145, 265–268.
- Lee, K.W., Shim, W.J., Kwon, O.Y., Kang, J.H., 2013. Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ. Sci. Technol.* 47 (19), 11278–11283.
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. Transformation:1–4. *Numer. Ecol.*
- Long, M., Paul-Pont, I., Hegaret, H., Moriceau, B., Lambert, C., Huvet, A., Soudant, P., 2017. Interactions between polystyrene microplastics and marine phytoplankton lead to species-specific hetero-aggregation. *Environ. Pollut.* 228, 454–463.
- 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 (5), 553–562.
- 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 (12), 2663–2670.
- 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.
- Mayer, S., 1994. Particle capture in the crown of the ciliary suspension feeding polychaete *Sabella penicillus*: videotape recordings and interpretations. *Mar. Biol.* 119 (4), 571–582.
- Mesaric, T., Gambardella, C., Milivojevic, T., Faimali, M., Drobne, D., Falugi, C., Makovec, D., Jemec, A., Sepic, K., 2015. High surface adsorption properties of carbon-based nanomaterials are responsible for mortality, swimming inhibition, and biochemical responses in *Artemia salina* larvae. *Aquat. Toxicol.* 163, 121–129.
- 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, 67–78.
- NF ISO 17244, 2015. Qualité de l'eau. Détermination de la toxicité d'échantillons aqueux sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et de la moule (*Mytilus edulis* ou *Mytilus galloprovincialis*).
- Parker, L.M., Ross, P.M., O'Connor, W.A., 2009. The effect of ocean acidification and temperature on the fertilization and embryonic development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850). *Glob. Chang. Biol.* 15 (9), 2123–2136.
- Paul-Pont, I., Tallec, K., Gonzalez Fernandez, C., Lambert, C., Vincent, D., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J.-L., Brotons, G., Lagarde, F., Fabioux, F., Soudant, P., Huvet, A., 2018. Constraints and priorities for conducting experimental exposures of marine organisms to microplastics. *Front. Mar. Sci.* 5 (252).
- PlasticsEurope, 2016. Plastics - the Facts 2016 - an Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data, 2016. PlasticsEurope.
- PlasticsEurope, 2018. Plastics – the Facts 2018. Brussels, Belgium: PlasticsEurope. <https://www.plasticseurope.org/fr/resources/publications/619-plastics-facts-2018>.
- Quiniou, F., His, E., Delesmont, R., Caisey, X., 2005. Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux : bio-essai "développement embryo-larvaire de bivalve". In: Ifremer (Ed.), Méthodes d'analyse en milieu marin.
- Robinson, A., 1992. Gonadal cycle of *Crassostrea gigas* kumamoto (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture* 106 (1), 89–97.
- Singh, R.S., 2000. Diseases of Fruit Crops. Science Publishers, Enfield, NewHampshire.
- Solow, A.R., Gallager, S.M., 1990. Analysis of capture efficiency in suspension feeding: application of nonparametric binary regression. *Mar. Biol.* 107 (2), 341–344.
- Suquet, M., Le Mercier, A., Rimond, F., Mingant, C., Haffray, P., Labbe, C., 2012. Setting tools for the early assessment of the quality of thawed Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) D-larvae. *Theriogenology* 78 (2), 462–467.
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M.E.J., Goic, N.L., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Charlotte, C., Julien, G., Johan, R., Ika, P.-P., Philippe, S., Arnaud, H., 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (9), 2430–2435.
- Sussarellu, R., Lebreton, M., Rouxel, J., Akcha, F., Rivière, G., 2018. Copper induces expression and methylation changes of early development genes in *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.* 196, 70–78.
- Sutherland, W.J., et al., 2016. A horizon scan of global conservation issues for 2016. *Trends Ecol. Evol.* 31 (1), 44–53.
- Tallec, K., Huvet, A., Di Poi, C., Gonzalez-Fernandez, C., Lambert, C., Petton, B., Le Goic, N., Berchel, M., Soudant, P., Paul-Pont, I., 2018. Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos. *Environ. Pollut.* 242, 1226–1235.
- Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M.B., Janssen, C.R., 2015. Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environ. Pollut.* 199, 10–17.
- Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., Köhler, A., 2012. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environ. Sci. Technol.* 46 (20), 11327–11335.
- Wagner, M., Scherer, C., Alvarez-Muñoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., Fries, E., Grosbois, C., Klasmeyer, J., Marti, T., Rodriguez-Mozaz, S., Urbatzka, R., Vethaak, A., Winther-Nielsen, M., Reifferscheid, G., 2014. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environ. Sci. Eur.* 26 (1), 12.
- Wang, W.X., Yang, Y., Guo, X., He, M., Guo, F., Ke, C., 2011. Copper and zinc contamination in oysters: subcellular distribution and detoxification. *Environ. Toxicol. Chem.* 30 (8), 1767–1774.
- Wang, J., Tan, Z., Peng, J., Qiu, Q., Li, M., 2016. The behaviors of microplastics in the marine environment. *Mar. Environ. Res.* 113, 7–17.
- Ward, J.E., 1996. Biodynamics of suspension-feeding in adult bivalve molluscs: particle capture, processing, and fate. *Invertebr. Biol.* 115 (3), 218–231.
- Ward, J.E., Targett, N.M., 1989. Influence of marine microalgal metabolites on the feeding behavior of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 101 (3), 313–321.
- Yin, L., Liu, H., Cui, H., Chen, B., Li, L., Wu, F., 2019. Impacts of polystyrene microplastics on the behavior and metabolism in a marine demersal teleost, black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *J. Hazard Mater.* 380, 120861.
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., Oda, K., 2016. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science* 351 (6278), 1196–1199.

RÉSULTATS MAJEURS

- ⇒ Les MP de polyéthylène (HDPE) particuliers affectent le développement embryon-larvaire avec l'apparition de malformations larvaires et des arrêts de développement plus importants pour les expositions aux MP de 4-6 et 11-13 μm .
- ⇒ Le comportement de nage des larves-D a aussi été impacté par les MP de 4-6 et 11-13 μm avec une diminution de la vitesse maximale de nage et des modifications des trajectoires de nage.
- ⇒ La présence d'agglomérats de microplastiques sur les cils locomoteurs et le manteau larvaire semble perturber le comportement de nage par les actions physiques et mécaniques des MP.
- ⇒ Hypothèse : les MP de petites tailles, pourraient avoir une toxicité due à la fixation plus importante à la surface des embryons durant le développement, mais aussi à la surface du manteau des larves-D.

B. Article 3 : Ingestion et effets sur le développement et le comportement natatoire sur les larves d'huître creuse (*C. gigas*) de microplastiques commerciaux fluorescents

Pour donner suite aux premiers résultats obtenus, sur les effets des MP de polyéthylène sur le stade embryon-larvaire, nous nous sommes intéressés au stade larvaire de 3 jours (72 h) de développement. A ce stade de vie, les larves d'huîtres, *Crassostrea gigas*, commencent à s'alimenter de manière exogène. Pour cela, des MP commerciaux fluorescents (1-5 μm) ont été testés. Afin de confirmer les résultats issus de l'article 2, nous avons exposé deux stades de développement distincts, (i) le stade embryon-larvaire de 24 h et (ii) les larves-D à 72 h durant différents pas de temps (1 h, 3 h et 5 h). Différentes concentrations ont été testées : 0 (control) ; 0,1 ; 1 et 10 mg.L^{-1} . Le comportement de nage et les anomalies de développement ont été analysés sur les larves-D de 24 h. Le comportement de nage et l'ingestion ont été analysés sur les larves-D de 72 h + temps d'exposition. Les premiers résultats obtenus ont montré des effets sur le comportement de nage avec une diminution significative de la vitesse maximale de nage en fonction des concentrations testées, à 24 h de développement. Des agglomérats de MP collés au niveau des cils locomoteurs et manteau des larves ont été constatées. De plus, une augmentation des taux d'anomalies de développement et arrêts de développement a pu être relevée à 24 h. Concernant les larves de 72 h, l'ingestion des MP par les larves-D et leur présence dans le tractus digestif ont pu être observées. Nous avons pu suivre l'ingestion en fonction du temps d'exposition. Nous avons montré une augmentation des quantités de MP présents dans le tractus digestif des larves avec une augmentation des concentrations d'exposition, mais pas avec une augmentation du temps d'exposition. Cependant, plus le temps d'exposition était long et plus le pourcentage de larve total ayant ingéré des MP, était élevé. De plus, nous avons quantifié le nombre de MP ingérés grâce à la fluorescence. A une concentration d'exposition de 0,1 mg.L^{-1} (tout temps d'exposition confondus), on obtient une ingestion de $14,7 \pm 0,8$ MP.larvae⁻¹ avec 47 % de larves-D ayant ingérés des MP. Cependant aucun effet significatif n'a été relevé sur le comportement de nage des larves de 72 h, ayant ingérés des MP. Ces résultats sont semblables aux non-effets déterminés sur les larves-D d'huître ayant ingérés des MP de PS (Cole & Galloway, 2015).

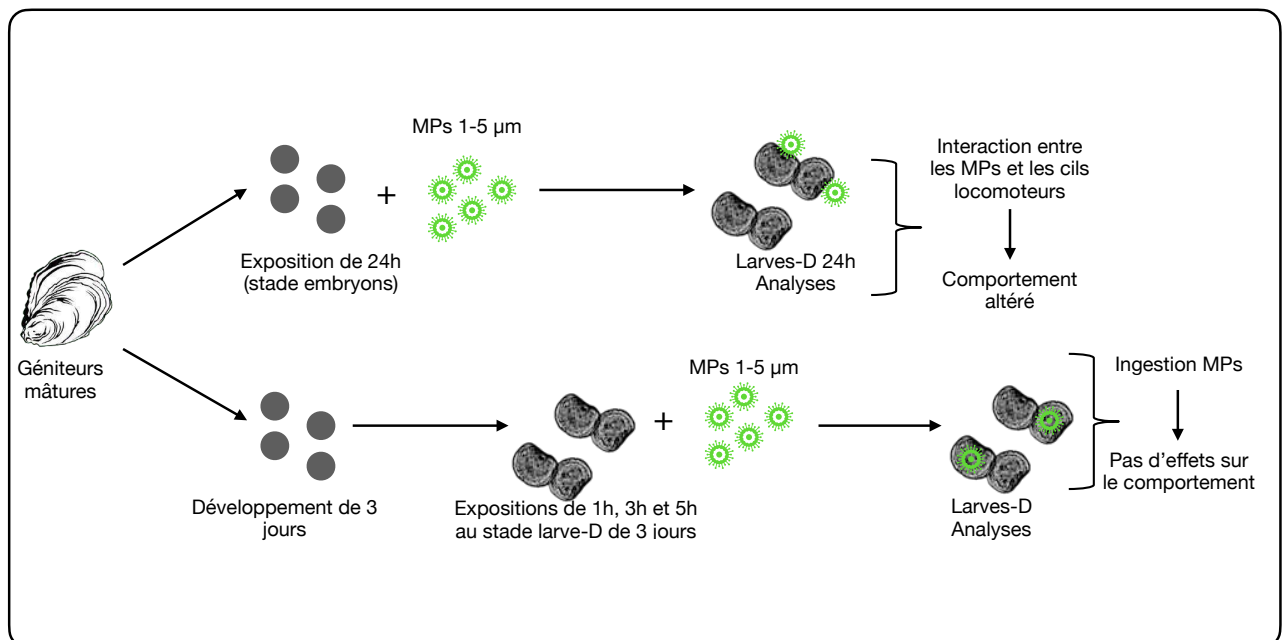


Figure 37. Schéma résumant les travaux réalisés dans le cadre de l'Article 3.



Experimental ingestion of fluorescent microplastics by pacific oysters, *Crassostrea gigas*, and their effects on the behaviour and development at early stages



Arno Bringer^{a,*}, Jérôme Cachot^b, Grégoire Prunier^a, Emmanuel Dubillot^a, Christelle Clérandeau^b, Hélène Thomas^a

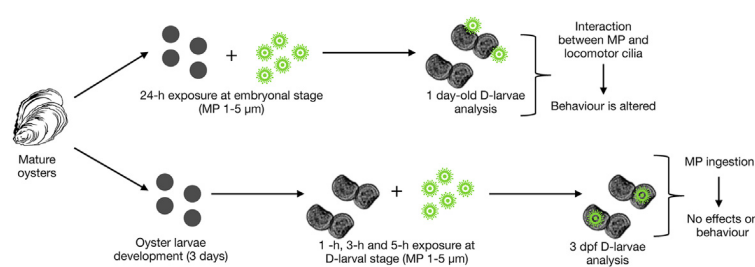
^a Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266, CNRS-Université, de La Rochelle, 2 Rue Olympe de Gouges, F-17042, La Rochelle Cedex 01, France

^b Université de Bordeaux, Laboratoire Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC), UMR 5805, F-33600, Pessac, France

HIGHLIGHTS

- Different development stages exposure to fluorescent microplastics (MPs) 1–5 μm .
- MPs affected swimming activity and development for 24 h oyster D-larvae.
- Presence of MPs on oyster D-larvae eyelashes and coat.
- Presence of MPs in digestive tract for 72 h oyster D-larvae.
- No MPs effects on swimming activity for 72 h oyster D-larvae.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 January 2020

Received in revised form

3 April 2020

Accepted 12 April 2020

Available online 19 April 2020

Handling Editor: Tamara S. Galloway

Keywords:

Microplastics

Oyster

D-larvae

Swimming behaviour

Ingestion

Malformations

ABSTRACT

Plastics are persistent synthetic polymers that accumulate as waste in the marine environment. Microplastics (MPs, <5 mm) can be found either as microbeads in body care and some industrial products or as plastic debris through degradation. Plastic microbeads (1–5 μm , fluorescent, Cospheric) were used to characterise the MP ingestion and determine their potential harmful effects on both the swimming behaviour and development of oyster D-larvae (*Crassostrea gigas*). For 24 h, embryos were first exposed to MPs at a temperature of 24 °C. In addition, 3 day-old D-larvae were exposed to the same temperature for 1, 3 and 5 h. Three concentrations of MPs were used: 0.1, 1 and 10 mg MP. L⁻¹. After a 24-h period of embryonic exposure, we noted that MP agglomerates were stuck to the D-larvae coat and locomotor eyelashes. We also observed a significant increase in severe malformations and developmental arrests for larvae exposed to MPs ranging from 1 mg MP. L⁻¹. In terms of swimming behaviour, the maximum speed recorded was lower for larvae exposed at 0.1 and 1 mg MP. L⁻¹. After an acute exposure to MPs, particles were found in the digestive tract of 3 dpf (days post fertilisation) D-larvae. After 1-h exposure, the concentrations tested (0.1, 1 and 10 mg MP. L⁻¹) resulted in respectively 38%, 86% and 98%. The larvae swimming behaviour was recorded and analysed. Unlike the results observed at the embryo-larval stage, 3-dpf larvae showed significant impacts with no dose-response effect.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Microplastic particles (0.1 μm – 5 mm) are the most numerically

* Corresponding author.

E-mail address: arno.bringer1@univ-lr.fr (A. Bringer).

abundant form of solid waste on Earth (Eriksen et al., 2014). In 2017, the world's plastic production nearly reached 350 million tons, including more than 64 million tons in Europe (Plastics Europe, 2018). Each year, approximately 4.8–12.7 million tons end in the oceans (Jambeck et al., 2015). Although there are significant regional differences in plastic use and disposal (Kershaw et al., 2011), at a worldwide level, the most used polymers are: polyethylene (PE), polypropylene (PP), polyethylene terephthalate (PET), polyvinyl chloride (PVC), polystyrene (PS) and polyamide (PA) (Andrady and Neal, 2009; PlasticsEurope, 2010).

Microplastics are plastic particles that are smaller than 5 mm in diameter (Arthur et al., 2009). The presence of MPs has been reported in almost all studied habitats around the globe (Ivar do Sul and Costa, 2014; Andrady, 2011; Law and Thompson, 2014). In 2013, the average concentration of MPs in the Northeast Atlantic was of 2.46 MP m⁻³ 89% of these MPs were smaller than 5 mm (Lusher et al., 2014). Microplastics can either be suspended in the water column (Lattin et al., 2004), buoy at surface water (Moore et al., 2001; Morét-Ferguson et al., 2010) or accumulate in sediments (Browne et al., 2011) in coastal waters (Ng and Obbard, 2006), rivers (Sadri and Thompson, 2014), estuaries (Browne et al., 2010) and ocean gyres (Maximenko et al., 2012). In aquatic ecosystems, the presence of plastics of different sizes and forms could negatively impact all levels of the marine food web, including the zooplankton one.

For instance, marine zooplankton (copepods, decapods, bivalve larvae, etc.) can ingest MPs directly or by trophic transfer (Lee et al., 2013; Setälä et al., 2014; Cole et al., 2013, 2015). MPs can also be transferred to higher trophic levels via mesozooplankton (Setälä et al., 2014 and Beiras et al., 2018). In addition, several studies documented the MP effects on the zooplankton's feeding behaviour, growth, development, reproduction and lifespan (Cole et al., 2015; Botterell et al., 2019).

Our study supports the idea that bivalves, including the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, are promising sentinel species to study the impacts of small MPs (<200 µm) (Bonanno and Orlando-Bonaca, 2018). The embryo-larval stage of oysters is frequently used as a bioassay in ecotoxicology, as this life stage is easy to obtain and is very sensitive to environmental pollutants (His et al., 1999a, 1999b; Mai et al., 2012; Mottier et al., 2013; Tallec et al., 2018). Oyster larvae can ingest micro and nanoplastics in the early stages (3–24 dpf) of their development (Cole et al., 2015). In the work carried out by Sussarellu et al. (2016), adult oysters *C. gigas* that were exposed to 2–6 µm polystyrene microplastics were used as oyster genitors. The authors then studied the MP impacts on larval malformations and growth and concluded to noticeable effects on larvae. Through their work, Bringer et al. (2020), demonstrated that polyethylene MPs had detrimental impact on the *C. gigas* swimming behaviour and larval development.

In this study, the effects of 1–5 µm MP on two early stages of oyster development were assessed: the embryo-larval stage at 24 h and D-larvae stage at 72 h. Two batches of larvae were used to test four concentrations (0, 0.1, 1 and 10 mg MP. L⁻¹). In the first phase, embryo larvae were exposed to MPs. Then, the MP effects on the D-larvae (24 h-old) malformations, developmental arrests and swimming behaviour were analysed. In the second phase, D-larvae were raised for 3 days – e.g. a stage with exogenous feeding (His et al., 1999a, 1999b) – and were then exposed to MPs at different exposure time intervals (1, 3 and 5 h).

There are several advantages in using fluorescent plastic microspheres. First, commercial MPs benefit from homogeneous sizes and shapes. Second, many plastic particles can be purchased with embedded fluorophores or pigments allowing easy visualisation in biodeposits and tissues (Ward et al., 2019a, 2b). For both experiments, the D-larvae swimming behaviour (including the maximum

speed and trajectories) was analysed. Our results provided relevant information on both the development and swimming behaviour of two different embryo-larval stages after acute exposure to MPs (1–5 µm).

2. Material and methods

2.1. Animal collection

Mature oysters (*Crassostrea gigas*, Bayne et al., 2017; Bayne et al., 2019) came from a commercial hatchery specialised in the year-round production of mature oysters (France Naissain, France). During the September-October 2018 period, the oysters were kept at approximately 4 °C for two days (which enabled us to have better quality laying eggs for the first tests to be carried out) and acclimatised for 2 h in filtered sea water (FSW) before being fertilised in laboratory conditions.

2.2. Seawater

Seawater was collected from the French island of Île de Ré (South West of France). After sampling, seawater was filtered using a membrane filter of 20 µm, 5 µm, 1 µm and 0.2 µm and a pump generating UVs to eliminate debris and microorganisms. FSW was stored at 4 °C with continuous bubbling and was used within 7 days. A few hours before the experiment, FSW was filtered again at 0.2 µm.

2.3. Gonad retrieval and fertilisation

Oyster genitors were spawn by thermal stimulation (alternating immersion in 18 °C and 28 °C seawater for 30 min) or by stripping the gonad (Mai et al., 2013; Gamain et al., 2017). At the time of the gamete expulsion, spawning males and females were individually isolated in beakers with 0.2 µm FSW. After analysing the gamete morphology under a microscope at 10× magnification (Nikon Eclipse), both eggs and sperm were selected for a single pairing. To eliminate faeces and debris, these were separately sieved through 50 µm and 100 µm meshes (Sefar Nitex). Sperm mobility was assessed and the number of eggs counted under a microscope at 20× magnification (Nikon Eclipse). Eggs were fertilised with sperm using a ratio of 1:10 (egg:sperm) and homogenised every 5 min with an agitator to prevent polyspermy. Fertilisation success was observed under a microscope, and embryos were then counted and transferred. The first batch was exposed to MPs for 24 h in order to observe their effects on the embryo-larval development. Embryos were transferred to 24-well microplates (Greiner Bio-One, Cellstar free of detectable DNase, RNase, human DNA and pyrogens. Content non-cytotoxic). The second batch was held in development for 72 h before being exposed to MPs for 1, 3 and 5 h. Oyster larvae began to feed on exogenous phytoplankton organisms from 48 to 72 h, before that they fed on their vitelline reserves (His et al., 1999a, 1999b). Embryos were transferred to 12-well microplates (Greiner Bio-One, Cellstar free of detectable DNase, RNase, human DNA and pyrogens. Content non-cytotoxic) for further development and exposure. For both batches, approximately 350–400 fertilised eggs were transferred in each well containing 2 mL of FSW (Fig. 1). These microplates were incubated in the dark at 24 °C to reach standard development (Robinson, 1992 and AFNOR, 2009). The first batch was incubated for 24 h and the second for 72 h (including additional stages of 1, 3 and 5 h for ingestion).

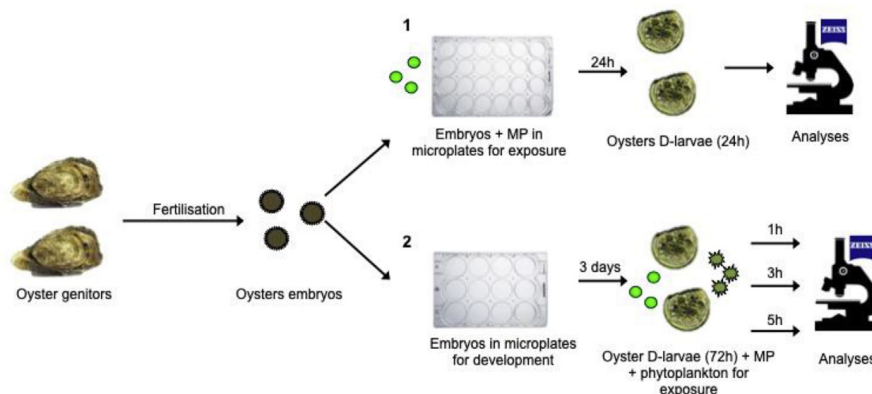


Fig. 1. Experimental design of both batches schematised, (1) embryonic exposure and analysis after a 24-h development; (2) larval exposure after 3 dpf and analysis after a 1, 3 and 5-h exposure.

2.4. Microplastic preparation and exposure conditions

The MPs used were fluorescent (510 nm excitation) and ranged between 1 and 5 μm (FMG - Green Fluorescent Microspheres 1.3 g/gcc 1–5 μm , Proprietary Polymer, Cospheric, California, USA). For the experiment, MP particles were scattered in the water column.

MP solutions were prepared in FSW 0.2 μm and stored in the dark at 2 °C to limit microbial growth. For the first batch, 2 mL of MP solution was put in the microplates with the embryos for a 24-h exposure. For the second batch, the 3-dpf D-larvae were exposed to MP microbeads for 1, 3 and 5 h 2 mL of MP solution and 50 μL of algae mixture (Roland et al., 1988; 50.000 cells. mL^{-1}) were injected in 12-well microplates containing 2 mL of larvae (3 dpf) suspended in FSW. A mix of *Isochrysis* spp. (*T.iso* strain) and *Skeletonema costatum* (5:1 ratio; France Naissain, France; Cole et al., 2015) was used for feeding and growth experiments. Algal size, biovolume and population density were assessed using a Nikon Eclipse microscope (x20). For both batches, three different concentrations were used: 0.1 mg MP. L^{-1} ; 1 mg MP. L^{-1} and 10 mg MP. L^{-1} excluding control treatment.

2.5. Chemical analyses

To carry out chemical analyses of 1–5 μm fluorescent MPs at 0.1; 1 and 10 mg MP. L^{-1} , each solution was assayed using a flow cytometer (Attune Acoustic Focusing Cytometer). 2 mL samples of MP solution used in embryo-larval exposure were vortexed (StarLab Vortex IR, 12 000 rpm for 20 s) before going into a cytometer to homogenise the solution ($n = 4/\text{condition}$). A volume of 300 μL was sampled using the cytometer, which operated at a flow rate of 500 $\mu\text{L min}^{-1}$. Control analytical samples ($n = 12$) contained 0.2 μm FSW (MPs excluded) to remove naturally-present particles. The maximum threshold to detect particles was set at 10 000 events. Mili-Q water samples ($n = 12$) were also assessed to check the relevance of the detected events (<200 events). Then, a calibration was performed for MPs of different sizes (HDPE MPs 4–6 μm MPP-635 XF, 11–13 μm MPP-635 G and 20–25 μm MPP-1241, density 0.96, Micropowders Inc. USA) to select the relevant ones to the study (1–5 μm and fluorescent).

2.6. Swimming behaviour (maximum speed recorded and trajectories)

Post-exposure (meaning after 24 h for the first batch and respectively 1, 3 and 5 h for the second batch), 2-min videos of D-

larvae were recorded using a 24 °C thermoregulated box (ZEISS Axio Observer Z1, x5) to determine their swimming behaviour (maximum speed and trajectories, Bringer et al., 2020). Then, oyster D-larvae were fixed (1% buffered formaldehyde) for abnormal larvae analysis. Formaldehyde was purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St. Quentin Fallavier, France). A video conversion free-ware (VirtualDub, Windows) set the frame rate at 4 FPS and converted it to AVI format. ImageJ (1,52a software) was used to analyse the videos. Videos (.avi) were opened and converted first into grayscale images, and then into binary images. For each video, a plugin was installed to deduce the swimming parameters of the recorded D-larvae. As a result, each larva was provided with a tracking number to easily identify them in the result file. It also included the maximum speed recorded (pixel. s^{-1}). In addition, swimming trajectories were assessed using an image file. Consequently, three different types of larval path were identified: (1) rectilinear, (2) circular and (3) motionless (Bringer et al., 2020). The use of a graphic tablet (Wacom Bamboo Pen & Touch) and image processing software (Photos, Windows 10) enabled swimming trajectories to be quantified and characterised. The same larva can be detected several times, entering and exiting the visual field (Gamain et al., 2019; Bringer et al., 2020).

The video created to assess the swimming behaviour is available upon request (additional data). The results displayed are expressed in mean \pm SEM for the three replicates (three different couples of oyster genitors). There are seven videos by couple, resulting in $n = 21$ videos/treatment.

Supplementary video related to this article can be found at doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126793.

2.7. Developmental abnormalities in D-larvae

After having recorded the D-larvae swimming behaviour, 25 μL of 1% buffered formalin was added to each well. A biometric analysis of larvae exposed for 24 h ($n = 15$) was carried out on the ImageJ software, using photos obtained by microscopy (ZEISS Axio Observer, Z1, x20). The larvae were measured, by drawing a dummy line lengthwise (Talmage and Gobler, 2009 and Helm et al., 2006). Then, the percentage of abnormal oyster larvae and developmental arrest was assessed (His et al., 1999a, 1999b and Quiniou et al., 2005). Both phenomena were observed under an inverted microscope (Nikon eclipse, x10). This test required to have less than 20% of abnormal larvae in control conditions (absence of contamination). Three different couples were used and four replicates each were performed. Screenshots of the recorded videos were taken

(VLC Media Player, Windows) to observe the contiguous MPs sticking on D-larvae (after a 24-h period). The results displayed are expressed in mean \pm SEM for the three replicates (three different couples of oyster genitors). Twelve wells for each condition were analysed using approximately 200 D-larvae in each well. This resulted in $n = 2400$ D-larvae analysed/treatment.

2.8. MP ingestion by 3-dpf D-larvae

To determine the MP presence or absence in 3-dpf D-larvae and the percentage of larvae ingesting microbeads, a digital reconstruction of the wells was created by superimposing pictures (GFC fluorescence, ZEISS Axio Observer Z1, \times 5 objective). By zooming well by well, a count of larvae was carried out (Figure S1). Three replicates (three different couples of oyster genitors) and four wells of each were analysed, resulting in $n = 12$ wells analyses/treatment.

The number of microspheres ingested by each larva was assessed through fluorescence intensity measurements. To do so, the ratio between the mean fluorescence intensity of each isolated bead ($n = 30$) and the fluorescence intensity in the D-larvae digestive tract ($n = 6$ /treatment) was calculated. Not only the fluorescence intensity of the MP beads in the larval gut indicated if the particles were ingested or not (Figure S2) but it enabled to precisely determine where these were located in the digestive tract. For this experiment, the 3-dpf larvae were individually and independently tested for MP ingestion, meaning that larvae for each exposure time interval were different. Three replicates (three different couples of oyster genitors) were analysed, resulting in $n = 6$ for each couple and $n = 18$ /treatment.

2.9. Statistics

The statistical analysis was conducted using R and graphs on Microsoft Excel, except the PCA-Biplot which was created on R Studio using the "FactoMineR" package. Homogeneity of variance (Levene's test) and normality of distribution (Shapiro-Wilk) were assessed. In order to compare the various treatments, an analysis of variance (ANOVA) using Tukey's post-hoc test was performed. For data not entering in the scope of a parametric test, a statistical analysis was carried out through the Kruskal-Wallis Test. Differences in tested concentration means were then assessed using the Kruskal Nemenyi Post-hoc test with the PMCMR package (the Tukey test equivalent for non-parametric data). When $p < 0.05$, significance was tolerated. Data are written as mean \pm SEM.

3. Results

3.1. MP exposure concentrations

The flow cytometry assays enabled to assess the theoretical MP concentrations in different assays. Theoretically speaking, a dilution factor of 10 between each working solution was expected. However, the actual dilution factor ranged from 7.9 to 9.5 (Table 1).

Table 1

Theoretical and measured fluorescent MP concentrations in different assays (0; 0.1; 1; 10 mg MP. L⁻¹) (mean values \pm SEM). These results were obtained by cytometry (Attune Acoustic Focusing Cytometer).

Theory&cal (mg MP.L-1)	Measured (MP.mL-1)	Dilu&on factor
0.1	7211 \pm 602	X
1	68 733 \pm 337	9.5
10	54 3528 \pm 42 646	7.9

3.2. Effects of MP exposure at the embryo-larval stage

When exposed to different MP concentrations for 24 h, the D-larvae swimming behaviour had a dose-response effect (Fig. 2a). Control larvae (without pollutant) swam faster ($167.4 \pm 5.1 \mu\text{m. s}^{-1}$) than exposed larvae. The lowest MP concentration (0.1 mg MP. L⁻¹) gave a maximum swimming speed of $148.5 \pm 3.7 \mu\text{m. s}^{-1}$ (Table S3). In terms of swimming trajectories (Fig. 2b), control larvae had predominant rectilinear trajectories ($66.4 \pm 0.4\%$). The swimming trajectories of exposed larvae were mostly circular (between 75 and 85%) for all MP concentrations. Thus, the MP concentrations did not influence their swimming trajectories. Regarding the biometric analysis, exposed D-larvae were significantly smaller (Table S3). For the 0.1 mg MP. L⁻¹ concentration, the D-larvae length reached $60.3 \pm 0.7 \mu\text{m}$. The average larvae length at 10 mg MP. L⁻¹ was of $55.9 \pm 6.3 \mu\text{m}$. These results differed from other conditions, particularly from control larvae which had a length of $73.6 \pm 6.7 \mu\text{m}$ (Table S3).

Regarding the malformations and developmental arrests of oyster D-larvae (Fig. 2c & d), a dose-response effect to exposure concentrations was noted. An abnormal larval rate was observed at the two highest concentrations of 1 and 10 mg MP. L⁻¹, with respectively $35.2 \pm 2.2\%$ and $37.3 \pm 2.0\%$ (Table S3). In contrast, malformed larvae in control conditions had a rate of $14.8 \pm 1.2\%$. In terms of developmental arrests, the highest rate was assessed at 10 mg MP. L⁻¹, with $15.3 \pm 1.6\%$ (Table S3). The higher the MP concentration was, the higher the rate of developmental arrests. On these screenshots (Figure S4), MPs formed agglomerates. In addition, they stuck on the mantle and the locomotor eyelashes of the 24-h D-larvae. On this picture (Figure S4, on the right), some MP agglomerates were larger than the larvae.

3.3. MP ingestion assessment and quantification in 3-dpf larvae at different time intervals

The ingestion of fluorescent MPs by 3-dpf oyster D-larvae was assessed. Larvae ingested beads after 1, 3 and 5 h of fluorescent MP exposure (Fig. 3a). We noted that the tested MPs tended to accumulate in the larvae digestive tract (Figure S2). However, there was no difference between the exposure time intervals for a given concentration (Fig. 3b). When reconstructing the wells of microplates, we managed to quantify the number of D-larvae that ingested MPs and the ones who did not (Fig. 3). A clear dose-response effect was observed. However, no impact was highlighted on the exposure time intervals (Fig. 4). The larvae that were exposed to 10 mg MP. L⁻¹ were more likely to have ingested MPs (98%) than the ones exposed to 1 mg MP. L⁻¹ (84%) or 0.1 mg MP. L⁻¹ (47%).

These results could be directly linked to the number of beads ingested by the oyster D-larvae and present in their digestive tract. Assessing the fluorescent content and intensity in larvae enabled to determine the number of beads ingested by each individual (Fig. 5a). Almost all oyster larvae exposed to 10 mg MP. L⁻¹ ingested MPs (98%, red circle, Fig. 5a). The different exposure time intervals were grouped in the graph as there was no significant difference for this parameter. Larvae exposed to 0.1 mg MP. L⁻¹ ingested an average of 14.7 ± 0.8 MP. larvae⁻¹ (grey circle, Fig. 5a), while the ones exposed to 1 mg MP. L⁻¹ (blue circle, Fig. 5) and 10 mg MP. L⁻¹ respectively ingested 35.7 ± 4.1 and 141.8 ± 5.2 MP. larvae⁻¹. There was no significant difference between the three MP concentrations for the amount of microbeads ingested by the D-larvae.

To correlate the 3 variables, a PCA-Biplot was created (Fig. 5b). Individuals who ingested high concentrations of MPs (fluorescence found in their digestive tract) were correlated to the percentage of larvae that ingested MPs. Groups of individuals (depending on their

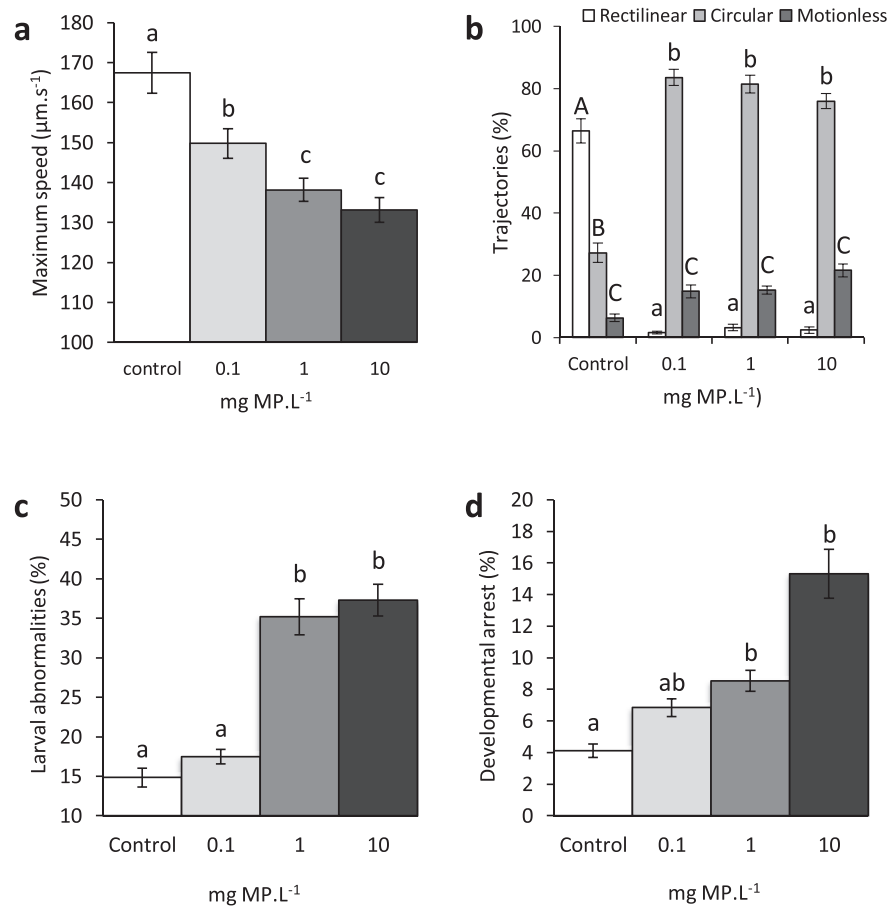


Fig. 2. (a) Maximum speed recorded, (b) swimming trajectories, (c) percentage of abnormal D-larvae and (d) developmental arrest of oyster D-larvae exposed for 24 h to various concentrations (0; 0.1; 1; 10 mg MP.L⁻¹) of fluorescent MPs (1–5 µm). Values are expressed as mean ± SEM for the three replicates. A variation in letters indicates significant differences between concentrations ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis for swimming behaviour and ANOVA for abnormal and developmental arrest quantification).

exposure conditions) were well distributed on the PCA. Moreover, “contribution” of variables highlighted that the number of MPs ingested by larvae was the variable that contributed the most to creating correlations.

3.4. Effects of MP exposure on 3-dpf larvae

For this experiment, D-larvae were bred for 3 dpf (72 h). Then, they were exposed to MPs (1–5 µm) for 1, 3 and 5 h. The effects of MP exposure to the larvae swimming behaviour was then analysed (Fig. 6).

After a 1-h exposure to different MP concentrations, the maximum speed recorded increased significantly for exposed D-larvae (Fig. 6a) in comparison to control larvae. However, there are no differences observed in terms of MP concentrations. After 3 and 5 h of exposure (Fig. 6b and 6 c), the results were quite heterogeneous; no trend could be defined. Regarding their swimming trajectories, control larvae had predominant circular trajectories (Fig. 6a). After 3 h, exposed larvae tended more towards circular trajectories when increasing MP concentration, although this is not significant. After a 5-h exposure, we noted a significant difference ($p > 0.05$) in swimming. Indeed, there was an increase in motionless trajectories ($p > 0.05$). At this stage of development (72-h D-larvae), swimming trajectories seemed not to be as strongly impacted by MPs.

4. Discussion

For the whole study, we examined two different developmental stages of oysters exposed to 1–5 µm fluorescent MPs: (1) embryos after being exposed for 24 h and (2) 3-dpf D-larvae after being exposed for 1, 3 and 5 h.

First of all, after a 24-h exposure, D-larvae exposed at the embryonic stage had MPs stuck on their locomotor cilia and their coat. They did not show any sign of MP ingestion. When embryos were directly in contact with fluorescent MPs, the (24-h) larvae body length was impacted. Exposed oyster D-larvae were smaller than unexposed ones. The consequences on larval size were previously documented by Sussarellu et al. (2016). When oyster broodstocks were exposed to 2 and 6 µm polystyrene beads, the larvae were smaller in size. Similarly, after being exposed to MPs (20 µm polystyrene beads), copepod eggs (*Calanus helgolandicus*) were smaller (Cole et al., 2015). However, these biometric results and growth abnormalities might be due to developmental delays and malformations directly impacting the D-larvae size. As mentioned, exposed oyster larvae showed abnormalities and developmental arrests. Some studies highlighted that contaminants such as heavy metals and pesticides caused developmental defects (Mai et al., 2012; Gamain et al., 2016, 2017). We observed similar phenomena when species were exposed to 4–6 µm polyethylene MPs (Bringer et al., 2020). In addition, a recent study has underlined that blue mussel larvae, *Mytilus edulis*, had malformations and

CHAPITRE IV – Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryonnaire et pédivélégère chez l'huître creuse (*C. gigas*)

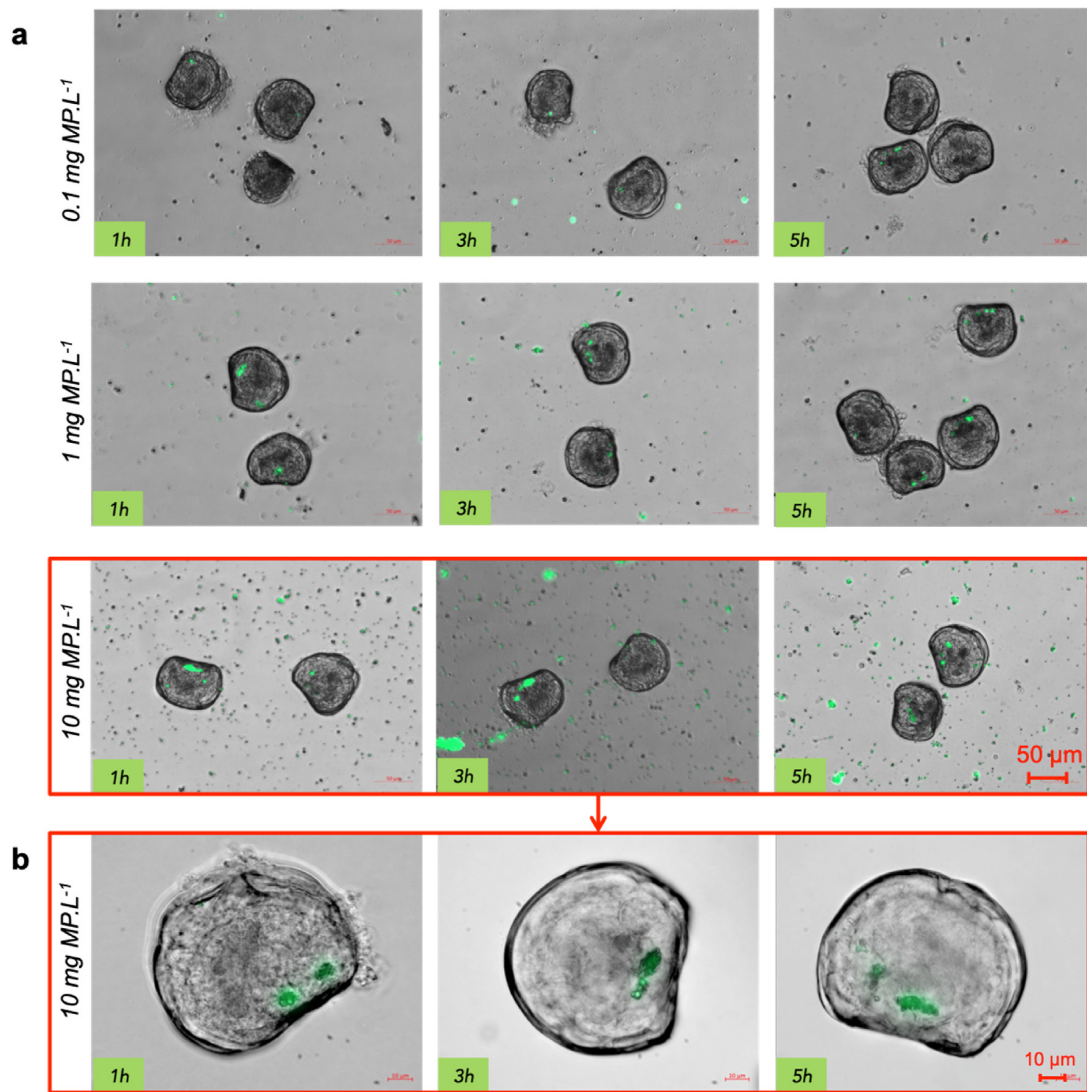


Fig. 3. Microscopic pictures ZEISS Axio Observer Z1, magnification $\times 20$ (a) and microscopic zoomed pictures on 10 mg MP. L⁻¹, ZEISS Axio Observer Z1, magnification $\times 60$ (b) of 3-dpf oyster D-larvae exposed at different time intervals (1, 3 and 5 h) and facing different concentrations of fluorescent MPs.

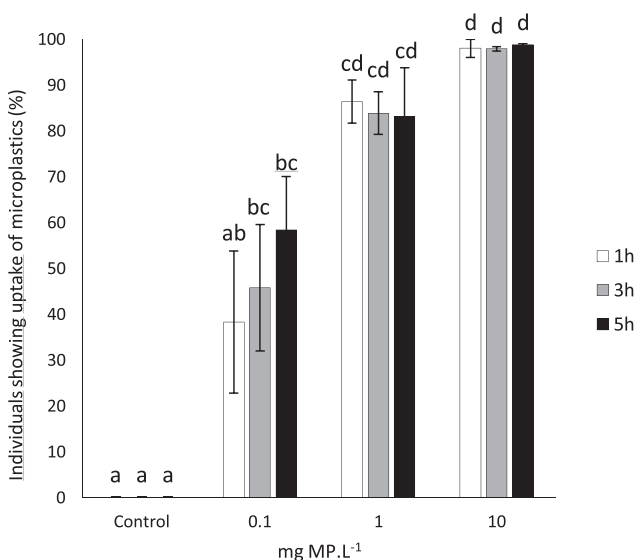


Fig. 4. MP ingestion by oyster D-larvae according to exposure time intervals (1, 3 and 5 h) and MP concentrations (0; 0.1; 1; 10 mg MP. L⁻¹). Bars are expressed as mean values \pm SEM for the three replicates. A variation in letters indicates significant differences ($p < 0.05$, ANOVA).

developmental defects after being exposed to 100 nm and 2 μ m polystyrene microbeads (Rist et al., 2019). In this study, we noted a sharp increase in malformed larval rate from 1 mg MP. L⁻¹ and a dose-dependent increase in developmental arrests up to 15% at 10 mg MP. L⁻¹. These results echoed a previous study using 4–6 μ m PE MPs (Bringer et al., 2020). Our findings were consistent with the results of Lei et al. (2018), who demonstrated that MP toxicity was size-dependant rather than polymer-dependant. The study highlighted that the swimming behaviour of D-larvae, in particular their maximum speed recorded and trajectories, was impacted by MPs. Exposed larvae swam slower and had predominant circular swimming trajectories. Gamain et al. (2019) also reached similar conclusions when studying oyster larvae exposed to copper and pesticides. In addition, a reduced swimming speed was observed in oyster D-Larvae exposed to different sizes of PE MPs (Bringer et al., 2020). According to our microscopic observations, MPs stuck on the larvae cilia. Several studies documented that MPs tended to bind on aquatic species and disturb their swimming behaviour. For instance, brine shrimps *Artemia franciscana* had MPs stuck to their antennae and consequently an abnormal swimming behaviour (Bergami et al., 2016). MPs also stuck on the tentacles of *Hydra attenuata*, which could impair feeding by restricting its ability to move and capture prey (Murphy

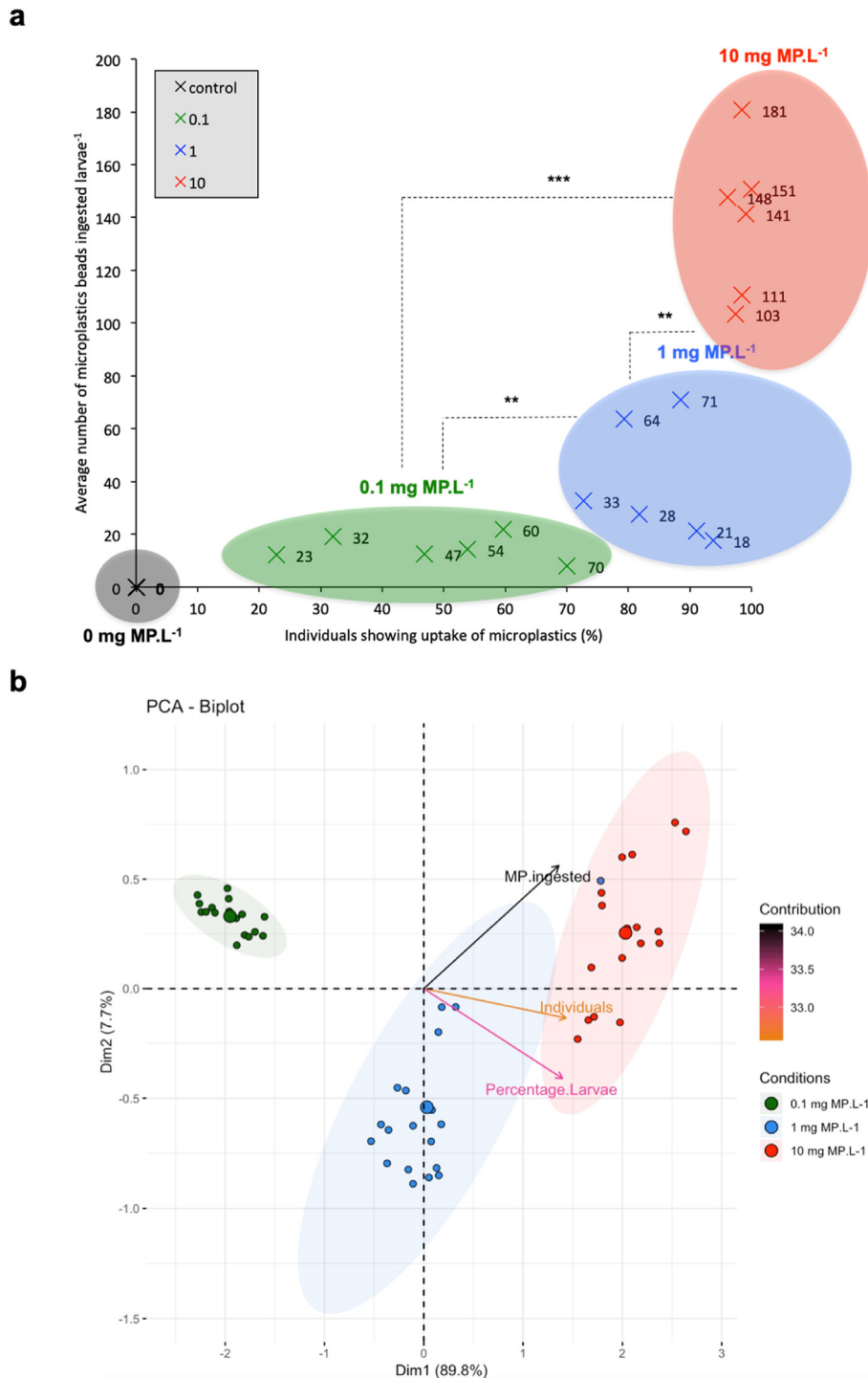


Fig. 5. Relationship between the number of oyster D-larvae that ingested MPs (%) and the mean number of microbeads ingested per larva (**a**) after 1, 3 and 5 h of exposure (n = 18). Asterisks indicate significant differences (Kruskal Wallis Test). Levels of significance: p < 0.1 = "."; p < 0.05 = "**"; p < 0.01 = "***"; p < 0.001 = "****" and (**b**) correlation plot (PCA-Biplot) between different variables: individuals, MPs ingested by larvae and percentage of larvae (%) presenting MPs in their digestive tract.

and Quinn, 2018). The observations on larvae exposed (*H. attenuata*) for 24 h underlined that MPs *quanta* (Alimi et al., 2018) were likely to impact their swimming behaviour, mainly their speed and trajectories.

In a second phase, 3-dpf larvae were analysed and exposed to MPs at different time intervals (1, 3 and 5 h). In previous studies, authors noticed that oyster larvae could ingest and accumulate MPs

in their digestive tract (Jones and Jones, 1988; Cole et al., 2015). Capture efficiency of small particles (ca. 1–6 µm) is species-specific and depends on the gill architecture and structure of the latero frontal cilia or cirri (Silverman et al., 1995; Ward and Shumway, 2004; Rosa et al., 2017, 2018). We noted that the higher the MP concentration was, the more particles the larvae ingested. However, no significant difference was observed in terms of exposure times.

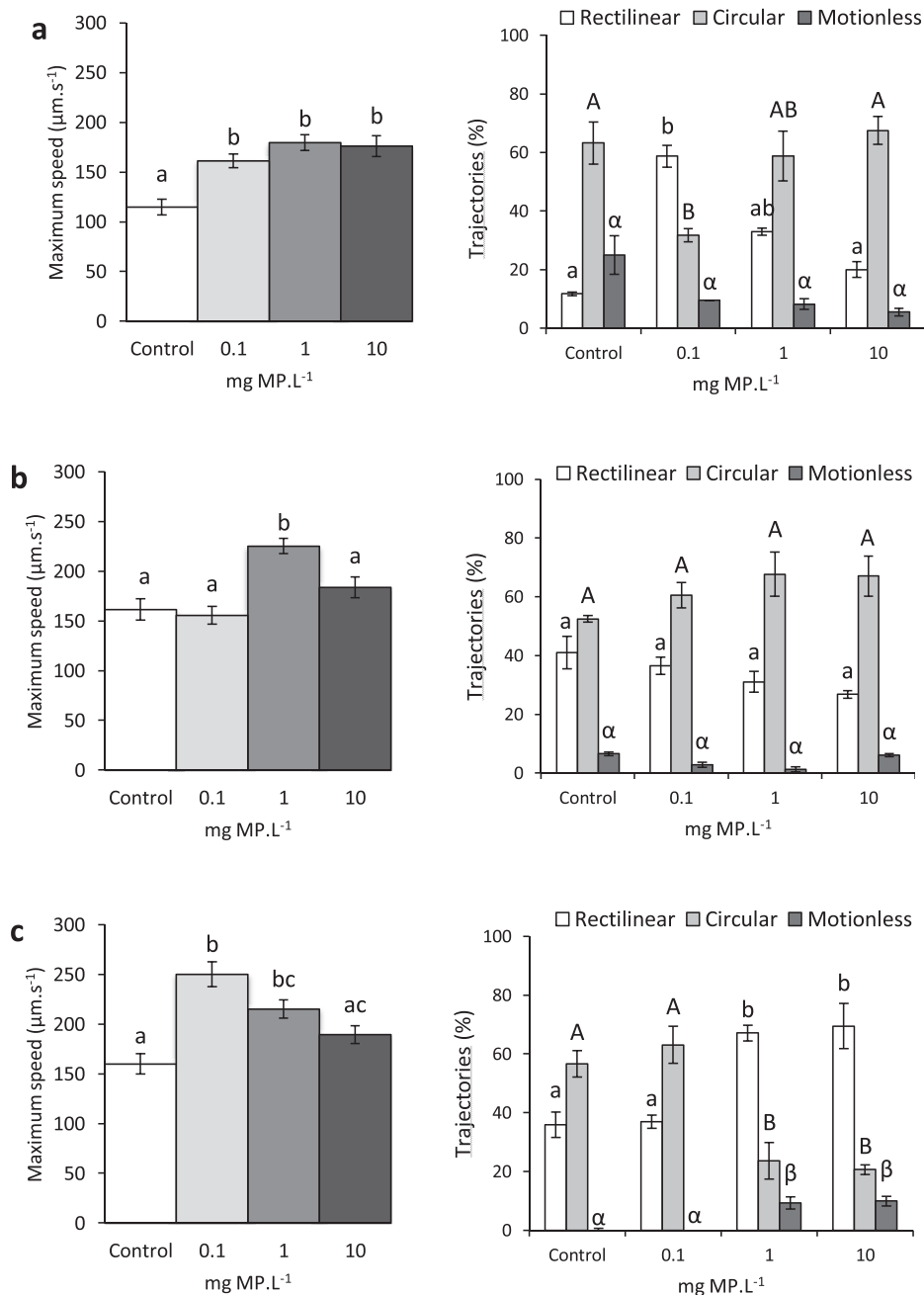


Fig. 6. Maximum speed recorded and swimming trajectories of 3-dpf oyster D-larvae after a 1 (a), 3 (b) and 5-h (c) exposure to fluorescent MPs at different concentrations (0; 0.1; 1; 10 mg MP.L⁻¹). Values are expressed as mean values ± SEM for the three replicates. A variation in letters indicates significant differences between different concentrations (p < 0.05, Kruskal-Wallis test).

This implies that D-larvae ingested MPs faster than they egested (Cole et al., 2016). The correlations in the PCA-Biplot highlighted that the larvae ingested and stored large quantities of MPs in their digestive tract when the experimental unit was loaded with particles. A previous study demonstrated that oyster (*C. gigas*) and slipper limpet (*C. fornicata*) larvae could deplete the nutrient stocks in their environment in no time (Blanchard et al., 2008).

MP ingestion and accumulation in the digestive tract of 3dpf D-larvae indicated an increase in their maximum swimming speed under certain contamination conditions. MP ingestion altered the maximum swimming speed and thus, to a lesser extent, the trajectories. However, this phenomenon was not observed for all

contaminated conditions. One cannot clearly conclude in a trend in duration nor in a dose-response effect.

In this study, we noticed that MPs tended to agglomerate and stick to the locomotor eyelashes of the 24 h-old larvae, which were not able to filter exogenous food and did not show MP ingestion. However, MPs were ingested by the 72-h D-larvae (3 dpf). This impacted their swimming behaviour as larvae with MPs clung on their eyelashes showed behavioural abnormalities while larvae that had ingested MPs did not demonstrate behavioural differences. This study underlined that the swimming behaviour and the development of the oyster were affected when exposed at embryonic stage to small PE MPs. For older larva exposed to MPs at 3

dpf, their swimming activity tended to increase when exposure time lasted up to 1 h. The larvae did not show significant difference in their swimming trajectories after being exposed to MPs.

Another study demonstrated that egestion rate kinetic of 1–5 µm fluorescent MPs by oyster larvae was fairly rapid (<3 h) and depended on the particle size (Ward et al., 2019a). Indeed, one could investigate the larvae MP egestion and exclude the possibility of re-ingestion (Rist et al., 2019) by developing a relevant protocol.

5. Conclusions

In this study, MPs stuck on the locomotor cilia of the D-larvae exposed for a 24-h period at the embryo-larval stage, modifying their maximum swimming speed and to, a lesser extent, their trajectories. We concluded that being exposed to small fluorescent MPs at the embryo-larval stage was detrimental for D-larvae (*C. gigas*), causing developmental abnormalities, changes in their swimming behaviour (both speed and trajectories) as well as developmental arrests after a 24-h period. The effects observed were dose-dependent.

In addition, 3-dpf exposed D-larvae ingested MPs, which were then observed in their digestive tracts. The higher the MP concentration was, the more MP particles the D-larvae tended to ingest. Regarding their swimming behaviour, we noted an increase in speed, especially for larvae exposed for a 1-h period. The swimming trajectories did not seem to be impacted by MPs. Further research on *Crassostrea gigas* and other bivalve species, such as *Mytilus edulis*, is essential to build up on our knowledge. This would help establish recommendations on the ecological risks of MPs in coastal and estuarine ecosystems.

Declaration of competing interest

We declare that we have no competing financial interests or known personal relationships that could have seemed to influence the work reported in this article.

CRedit authorship contribution statement

Arno Bringer: Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Writing - original draft, Visualization, Funding acquisition. **Jérôme Cachot:** Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Writing - review & editing, Supervision, Project administration. **Grégoire Prunier:** Formal analysis, Resources. **Emmanuel Dubillot:** Methodology, Resources. **Christelle Clérandeau:** Methodology, Resources. **Hélène Thomas:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Writing - review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Acknowledgment

Arno Bringer received a PhD grant (Comité Régional de la Conchyliculture de la Charente-Maritime CRC17) as well as financial support from the Région Nouvelle Aquitaine and the Comité Départemental de la Charente Maritime (CD17) to develop his research. The AQUAECOs project (Amélioration de la Qualité Environnementale sur les zones Conchylicoles des Pertuis Charentais), a partnership with CRC17 and the AFB (French Biodiversity Agency) contributed to this study. Funds were also given by the University of La Rochelle, the University of Bordeaux and the Centre National de la Recherche Scientifique (France). We are grateful to Oriane Titeca for proofreading the language. We wish to thank our collaborators for their work and help.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126793>.

References

- Alimi, O.S., Farner Budarz, J., Hernandez, L.M., Tufenkji, N., 2018. Microplastics and nanoplastics in aquatic environments: aggregation, deposition, and enhanced contaminant transport. *Environ. Sci. Technol.* 52 (4), 1704–1724.
- Andrady, A.L., Neal, M.A., 2009. Applications and societal benefits of plastics. *Phil. Trans. Biol. Sci.* 364 (1526), 1977–1984.
- Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62 (8), 1596–1605.
- Arthur, C., Baker, J.E., Bamford, H.A., 2009. Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris, September vols. 9–11. University of Washington Tacoma, Tacoma, WA, USA, p. 2008.
- Bayne, B.L., Ahrens, M., Allen, S.K., D'auriac, M.A., Bäckeljau, T., Beninger, P., Bohn, R., Boudry, P., Davis, J., Green, T., Guo, X., Hedgcock, D., Ibarra, A., Kingsley-Smith, P., Krause, M., Langdon, C., Lapegue, S., Li, C., Manahan, D., Mann, R., Perez-Paralle, L., Powell, E.N., Rawson, P.D., Speiser, D., Sanchez, J.-L., Shumway, S., Wang, H., 2017. The proposed dropping of the genus *Crassostrea* for all pacific cupped oysters and its replacement by a new genus *magallana*: a dissenting view. *J. Shellfish Res.* 36, 545–547.
- Bayne, B., d'Auriac, M.A., Bäckeljau, T., Beninger, P., Boudry, P., Carnegie, R., Langdon, C., 2019. A scientific name for Pacific oysters. *Aquaculture* 499, 373.
- Beiras, R., Bellas, J., Cachot, J., Cormier, B., Cousin, X., Engwall, M., Gambardella, C., Garaventa, F., Keiter, S., LeBihanic, F., Lopez-Ibanez, S., Piazza, V., Rial, D., Tato, T., Vidal-Linan, L., 2018. Ingestion and contact with polyethylene microplastics does not cause acute toxicity on marine zooplankton. *J. Hazard Mater.* 360, 452–460.
- Bergami, E., Bocci, E., Vannuccini, M.L., Monopoli, M., Salvati, A., Dawson, K.A., Corsi, I., 2016. Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp *Artemia franciscana* larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 123, 18–25.
- Blanchard, M., Pechenik, J.A., Giudicelli, E., Connan, J.P., Robert, R., 2008. Competition for food in the larvae of two marine molluscs, *Crepidula fornicata* and *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 21 (2), 197–205.
- Bonanno, G., Orlando-Bonaca, M., 2018. Perspectives on using marine species as bioindicators of plastic pollution. *Mar. Pollut. Bull.* 137, 209–221.
- Botterell, Z.L., Beaumont, N., Dorrington, T., Steinke, M., Thompson, R.C., Lindeque, P.K., 2019. Bioavailability and effects of microplastics on marine zooplankton: a review. *Environ. Pollut.* 245, 98–110.
- Bringer, A., Thomas, H., Prunier, G., Dubillot, E., Bossut, N., Churlaud, C., Clérandeau, C., Le Bihanic, F., Cachot, J., 2020. High density polyethylene (HDPE) microplastics impair development and swimming activity of Pacific oyster D-larvae, *Crassostrea gigas*, depending on particle size. *Environ. Pollut.* 113978.
- Browne, M.A., Galloway, T.S., Thompson, R.C., 2010. Spatial patterns of plastic debris along estuarine shorelines. *Environ. Sci. Technol.* 44 (9), 3404–3409.
- Browne, M.A., Crump, P., Niven, S.J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., Thompson, R., 2011. Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. *Environ. Sci. Technol.* 45 (21), 9175–9179.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., Galloway, T.S., 2013. Microplastic ingestion by zooplankton. *Environ. Sci. Technol.* 47, 6646–6655.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Galloway, T.S., 2015. The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. *Environ. Sci. Technol.* 49 (2), 1130–1137.
- Cole, M., Lindeque, P.K., Fileman, E., Clark, J., Lewis, C., Halsband, C., Galloway, T.S., 2016. Microplastics alter the properties and sinking rates of zooplankton faecal pellets. *Environ. Sci. Technol.* 50 (6), 3239–3246.
- do Sul, J.A.I., Costa, M.F., 2014. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. *Environ. Pollut.* 185, 352–364.
- Eriksen, M., Lebreton, L.C., Carson, H.S., Thiel, M., Moore, C.J., Borroero, J.C., et al., 2014. Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PLoS One* 9 (12), e111913.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Pardon, P., Tapie, N., Gourves, P.Y., Budzinski, H., Morin, B., 2016. Combined effects of pollutants and salinity on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 113, 31–38.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Clérandeau, C., Mazzella, N., Gourves, P.Y., Morin, B., 2017. Combined effects of temperature and copper and S-metolachlor on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Pollut. Bull.* 115 (1–2), 201–210.
- Gamain, P., Romero-Ramirez, A., Gonzalez, P., Mazzella, N., Gourves, P.Y., Compan, C., Morin, B., Cachot, J., 2019. Assessment of swimming behavior of the Pacific oyster D-larvae (*Crassostrea gigas*) following exposure to model pollutants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–11.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2006. Hatchery operation: culture of larvae basic methodology, feeding and nutrition, factors influencing growth and survival, and settlement and metamorphosis. *Hatchery Culture of Bivalves: A Practical Manual*. FAO Fisheries Technical Paper (471).
- His, E., Heyvang, I., Geffard, O., De Montaudouin, X., 1999a. A comparison between

CHAPITRE IV – Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryo-larvaire et pédivéligère chez l'huître creuse (*C. gigas*)

10

A. Bringer et al. / Chemosphere 254 (2020) 126793

- oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Res.* 33 (7), 1706–1718.
- His, E., Beiras, R., Seaman, M.N.L., 1999b. The assessment of marine pollution-bioassays with bivalve embryos and larvae. In: *Advances in Marine Biology*, vol. 37. Academic press, pp. 1–178.
- Jambeck, J.R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., Law, K.L., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* 347, 768e771.
- Jones, G., Jones, B., 1988. *Advances in the Remote Setting of Oyster Larvae*. BC Ministry of Agriculture and Fisheries.
- Kershaw, P., Katsuhiko, S., Lee, S., Woodring, D., 2011. *Plastic Debris in the Ocean*. United Nations Environment Programme.
- Lattin, G.L., Moore, C.J., Zellers, A.F., Moore, S.L., Weisberg, S.B., 2004. A comparison of neustonic plastic and zooplankton at different depths near the southern California shore. *Mar. Pollut. Bull.* 49 (4), 291–294.
- Law, K.L., Thompson, R.C., 2014. Microplastics in the seas. *Science* 345 (6193), 144–145.
- Lee, K.W., Shim, W.J., Kwon, O.Y., Kang, J.H., 2013. Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ. Sci. Technol.* 47 (19), 11278–11283.
- Lei, L., Wu, S., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Fu, Z., Shi, H., Raley-Susman, K.M., He, D., 2018. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Sci. Total Environ.* 619, 1–8.
- Lusher, A.L., Burke, A., O'Connor, I., Officer, R., 2014. Microplastic pollution in the Northeast Atlantic Ocean: validated and opportunistic sampling. *Mar. Pollut. Bull.* 88 (1–2), 325–333.
- 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.
- 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 (12), 2663–2670.
- Maximenko, N., Hafner, J., Niiler, P., 2012. Pathways of marine debris derived from trajectories of Lagrangian drifters. *Mar. Pollut. Bull.* 65 (1–3), 51–62.
- Moore, C.J., Moore, S.L., Leecaster, M.K., Weisberg, S.B., 2001. A comparison of plastic and plankton in the North Pacific central gyre. *Mar. Pollut. Bull.* 42 (12), 1297–1300.
- Morét-Ferguson, S., Law, K.L., Proskurowski, G., Murphy, E.K., Peacock, E.E., Reddy, C.M., 2010. The size, mass, and composition of plastic debris in the western North Atlantic Ocean. *Mar. Pollut. Bull.* 60 (10), 1873–1878.
- 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, 67–78.
- Murphy, F., Quinn, B., 2018. The effects of microplastic on freshwater *Hydra attenuata* feeding, morphology & reproduction. *Environ. Pollut.* 234, 487–494.
- Ng, K.L., Obbard, J.P., 2006. Prevalence of microplastics in Singapore's coastal marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 52 (7), 761–767.
- Plastics Europe, 2018. *Plastics – the Facts 2018. An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data*. <http://www.plasticseurope.org>.
- PlasticsEurope, 2010. *Plastics – the Facts*. <http://www.plasticseurope.org>.
- Quiniou, F., His, E., Delesmont, R., Caisey, X., 2005. Bio-indicateur de la toxicité aqueux: “development embryo-larvaire de bivalve”. Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu marin.
- Rist, S., Baun, A., Almeda, R., Hartmann, N.B., 2019. Ingestion and effects of micro- and nanoplastics in blue mussel (*Mytilus edulis*) larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 140, 423–430.
- Robinson, A., 1992. Gonadal cycle of *Crassostrea gigas* kumamoto (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture* 106 (1), 89–97.
- Roland, B., Sutherland, I.R., Broadley, T.A., 1988. Update on remote setting Pacific oyster larvae in British Columbia. *Br. Columbia Aquac. Info. Bull.* 15, 10.
- Rosa, M., Ward, J.E., Frink, A., Shumway, S.E., 2017. Effects of surface properties on particle capture by two species of suspension-feeding bivalve molluscs. *Am. Malacol. Bull.* 35 (2), 181–189.
- Rosa, M., Ward, J.E., Shumway, S.E., 2018. Selective capture and ingestion of particles by suspension-feeding bivalve molluscs: a review. *J. Shellfish Res.* 37 (4), 727–747.
- Sadri, S.S., Thompson, R.C., 2014. On the quantity and composition of floating plastic debris entering and leaving the Tamar Estuary, Southwest England. *Mar. Pollut. Bull.* 81 (1), 55–60.
- Setälä, O., Fleming-Lehtinen, V., Lehtiniemi, M., 2014. Ingestion and transfer of microplastics in the planktonic food web. *Environ. Pollut.* 185, 77–83.
- Silverman, H., Achberger, E.C., Lynn, J.W., Dietz, T.H., 1995. Filtration and utilization of laboratory-cultured bacteria by *Dreissena polymorpha*, *Corbicula fluminea*, and *Carunculina texasensis*. *Biol. Bull.* 189 (3), 308–319.
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M.E.J., Goic, N.L., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Charlotte, C., Julien, G., Johan, R., Ika, P.-P., Philippe, S., Arnaud, H., 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 113 (9), 2430–2435.
- Tallec, K., Huvet, A., Di Poi, C., Gonzalez-Fernandez, C., Lambert, C., Petton, B., Le Goic, N., Berchel, M., Soudant, P., Paul-Pont, I., 2018. Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos. *Environ. Pollut.* 242, 1226–1235.
- Talmage, S.C., Gobler, C.J., 2009. The effects of elevated carbon dioxide concentrations on the metamorphosis, size, and survival of larval hard clams (*Mercenaria mercenaria*), bay scallops (*Argopecten irradians*), and Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Limnol. Oceanogr.* 54 (6), 2072–2080.
- Ward, J.E., Shumway, S.E., 2004. Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension-and deposit-feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 300 (1–2), 83–130.
- Ward, J.E., Rosa, M., Shumway, S.E., 2019a. Capture, ingestion, and egestion of microplastics by suspension-feeding bivalves: a 40-year history. *Anthropocene Coasts* 2 (1), 39–49.
- Ward, J.E., Zhao, S., Holohan, B.A., Mladinich, K.M., Griffin, T.W., Wozniak, Shumway, S.E., 2019. Selective Ingestion and Egestion of Plastic Particles by the Blue Mussel (*Mytilus edulis*) and Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*): Implications for Using Bivalves as Bioindicators of Microplastic Pollution. *Environmental science & technology* 53 (15), 8776–8784.
- XP T90-382 Septembre 2009. *Qualité de l'eau – Bio indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux – Détermination de la toxicité potentielle d'échantillons aqueux sur le développement embryo-larvaire de bivalve – T90-382*.

RÉSULTATS MAJEURS

À 24 h de développement :

- ⇒ Les MP fluorescents (polymères industriels commerciaux) montrent des effets sur le développement embryo-larvaire avec une induction de malformations et d'arrêt de développement plus importante.
- ⇒ Des effets sont aussi visible sur la vitesse de nage maximale et les trajectoires. Ces résultats sont semblables aux effets des MP de HDPE commerciaux testés précédemment (*cf.* article 2).

À 72 h de développement :

- ⇒ Les larves ingèrent des MP qui viennent se loger dans le tractus digestif. Plus le temps d'exposition est long et plus le pourcentage de larves ayant ingérées des MP est important. Plus la concentration en MP est forte et plus les larves accumulent des MP par filtration.
- ⇒ Aucun effet significatif n'a pu être observé sur le comportement de nage pour les larves de 72 h de développement à la suite d'une exposition aux MP fluorescents.

Hypothèse : effets mécaniques des MP sur le manteau et cils locomoteurs des larves à 24 h (stress important). A 72 h, l'excrétion pourrait potentiellement être rapide, pour éviter les dommages cellulaires ou tissulaires (résultats à confirmer par des tests complémentaires).

C. Article 4 : Évaluation de la toxicité et des risques de six pesticides commerciaux, sur le développement, la croissance et le comportement larvaire de l'huître creuse (*C. gigas*)

Forte de son potentiel économique agricole, la région Nouvelle-Aquitaine se positionne en première place en France et en Europe, en termes de superficie agricole (84 000 km², soit 15,5 % du territoire national). Le secteur des Pertuis Charentais possède trois fleuves principaux (Sèvre Niortaise, Charente et Seudre) se déversant dans le milieu côtier marin. Les substances phytosanitaires, utilisées en agriculture, ruissèlent dans les eaux fluviales et se retrouvent régulièrement détectées dans les eaux marines, proches des zones conchylicoles. Cette présente étude se focalise sur les effets de six substances pesticides, retrouvées dans les Pertuis Charentais, sur le stade embryo-larvaire chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. En suivant le même protocole d'exposition que précédemment, les embryons ont été exposés séparément aux 6 composés durant 24 h à 24 °C. Par la suite, les larves-D obtenues ont été analysées au niveau de leur comportement de nage (vitesse de nage), du développement (malformations et arrêts de développement) et de la croissance larvaire. Le suivi des pesticides dans les zones côtières, réalisé par le laboratoire Qualyse (La Rochelle) et le Département de la Charente-Maritime (CD 17), nous a permis d'obtenir des données de concentrations environnementales dans les Pertuis Charentais, sur la période 2018-2020. Dans cette présente étude, les concentrations testées de pesticides vont de 0 (control) à 10 µg.L⁻¹. Les six pesticides testés sont le Glyphosate et sa solution commerciale (Roundup), l'Isoproturon, le Nicosulfuron, le Chlortoluron et la Boscalid. On retrouve donc plusieurs herbicides dont certains appartiennent à la famille des urées substituées et un fongicide (Boscalid). Les principaux résultats de cette étude nous montrent une augmentation des anomalies de développement et des arrêts de développement pour tous les pesticides testés (à partir de 0,03 µg.L⁻¹ pour la Boscalid). Les mesures de croissance ont montré un retard de croissance à 24 h pour le Roundup, le Nicosulfuron, le Chlortoluron et la Boscalid. En ce qui concerne l'activité de nage, les larves nagent moins vite lorsqu'elles sont exposées au Roundup, Nicosulfuron, Chlortoluron et Boscalid. Avec ces résultats, nous avons pu déterminer la LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) pour chaque pesticide testé. De plus, en comparant ces valeurs de LOEC avec les C_{max} et C_{avg} (Concentrations maximales et moyennes détectées dans les eaux marines des Pertuis Charentais, durant la période estivale), nous avons réalisé une évaluation du risque environnemental de chaque pesticide. Le Chlortoluron et la Boscalid semblent être les substances les plus toxiques et à risque pour l'environnement et les stades précoces chez l'huître creuse, *C. gigas*.

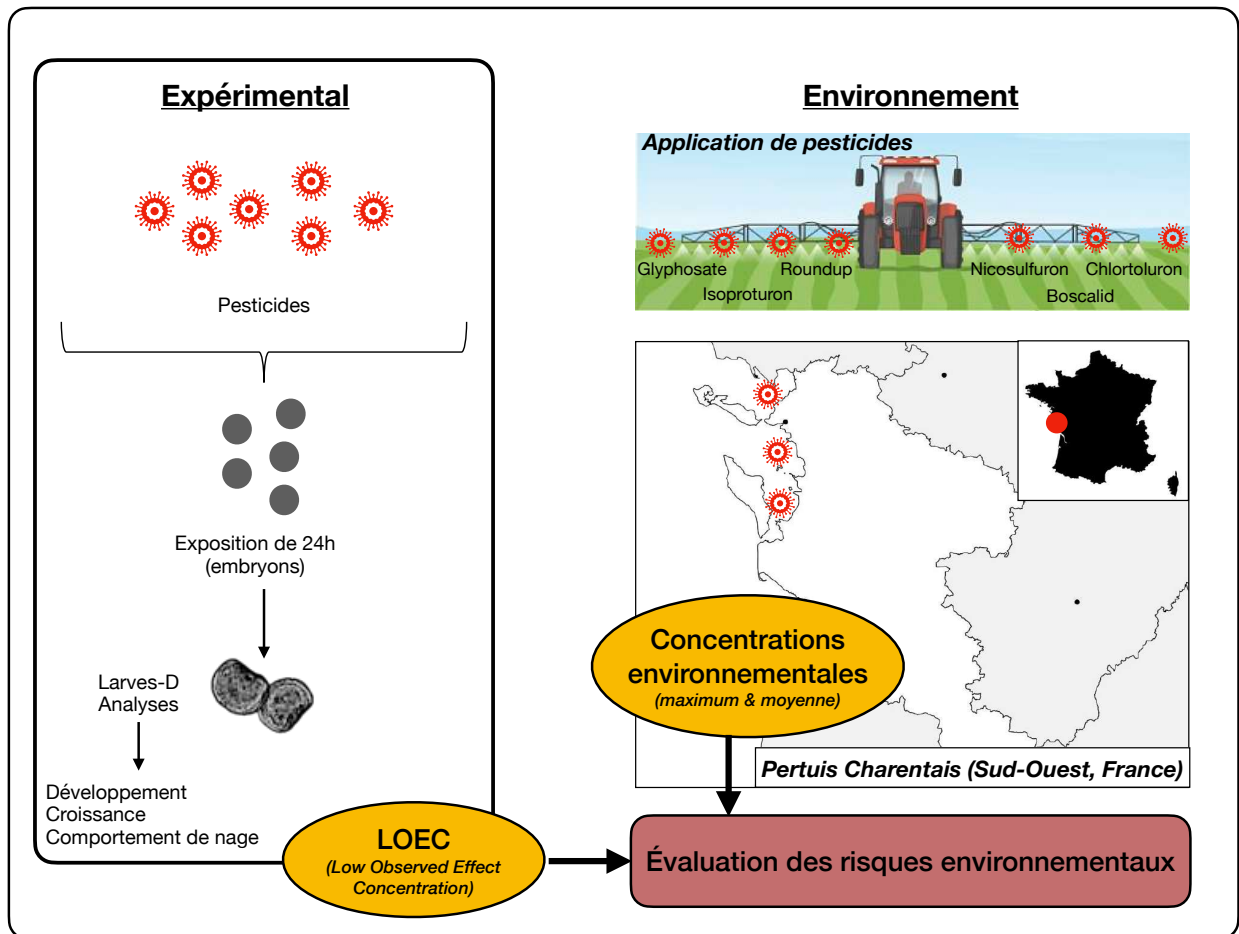


Figure 38. Schéma résumant les travaux réalisés dans le cadre de l'Article 4.



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Toxicity and risk assessment of six widely used pesticides on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*



Arno Bringer^a, Hélène Thomas^a, Grégoire Prunier^a, Emmanuel Dubillot^a, Christelle Clérandeau^b, Marius Pageaud^c, Jérôme Cachot^{b,*}

^a Littoral Environnement et Sociétés (LIENS), UMR 7266, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

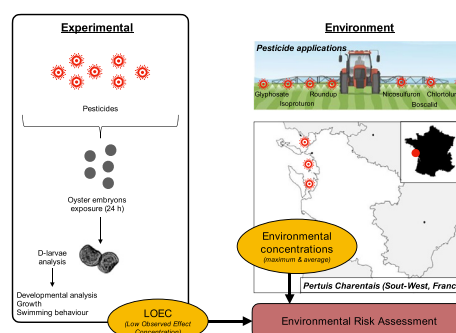
^b Université Bordeaux, CNRS, EPOC, EPHE, UMR 5805, F-33600 Pessac, France

^c Qualyse, 5 allée de l'Océan, F-17000 La Rochelle, France

HIGHLIGHTS

- Pacific oyster embryos are exposed to six widely used pesticides.
- Effects on development, growth and swimming activity are recorded.
- The six pesticides induce developmental defects at moderate and high concentrations.
- Several pesticides affect growth and/or swimming behaviour of larvae.
- Chlortoluron, boscalid and glyphosate represent a risk for oyster embryos in the Pertuis Charentais.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2020

Received in revised form 4 March 2021

Accepted 4 March 2021

Available online 13 March 2021

Editor: Daniel Wunderlin

Keywords:

Embryotoxicity

Oyster

D-larvae

Pesticides

Growth

Swimming behaviour

ABSTRACT

This study aims to assess the toxic effects and the potential risk of widely used agricultural pesticides on the development (malformations and developmental arrest), growth and swimming activity of oyster D-larvae (*Crassostrea gigas*). Freshly fertilized oyster embryos were exposed for 24 h at 24 °C to different concentrations (0, 0.01, 0.1, 1 and 10 µg.L⁻¹) of six different pesticides: Glyphosate and its commercial solution (Roundup), Isoproturon, Nicosulfuron, Chlortoluron and Boscalid. The six pesticides tested induced a significant increase in larval malformations and developmental arrests. All pesticides except Glyphosate and Isoproturon affected larval growth. Roundup, Nicosulfuron, Chlortoluron and Boscalid also affected the swimming behaviour of the D-larvae, with a significant decrease recorded in their maximum swimming speed. Comparison of the LOEC (Lowest-Observed-Effect Concentration) of each compound led to the following toxicity classification: Boscalid > Chlortoluron = Nicosulfuron > Glyphosate > Roundup > Isoproturon, with respectively LOEC of 0.0028; 0.015; 0.017; 0.11; 0.3 and 0.78 µg.L⁻¹. By comparison of the maximum concentrations in the Pertuis Charentais (South West, France) and LOEC of each pesticide, the following risk scale was obtained: Chlortoluron > Boscalid > Glyphosate > Roundup > Nicosulfuron > Isoproturon. Our results revealed that Chlortoluron, Boscalid and to a lesser extent Glyphosate represent a potential threat to early life stages of oyster living in the Pertuis Charentais marine area.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Estuaries and rivers are significantly affected by contaminants of terrestrial origin such as pesticides, plastics, hydrocarbons, metals, etc. Pesticides are used in agriculture to protect against weeds, diseases

* Corresponding author.

E-mail address: jerome.cachot@u-bordeaux.fr (J. Cachot).

and pests that are potentially harmful for crops (Breteau et al., 2000). Because of their widespread use and the ease with which they spread (air, water runoff, water percolation, precipitations, soil leaching), pesticides can be found in all areas of the biosphere, i.e. the hydrosphere, atmosphere, geosphere and aquatic ecosystems (Spencer and Clian, 1990; Stachowski-Haberkorn et al., 2014). According to Aubertot et al. (2005), only 25 to 80% of pesticides applied actually reach their target and a significant proportion of the pesticides used is subsequently transported to estuarine and coastal marine waters.

The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, was first introduced into France in 1967, and is now the main bivalve species cultivated in the country (Mottier et al., 2013). France is the 2nd biggest producer of shellfish in Europe, producing 250,000 tons per year, including 130,000 tons of oysters (CNC, 2020). The Pertuis Charentais (South-West, France) is the most productive area, accounting for 23% of all oysters produced in France (CNC, 2016). In this region, mortality events first occurred during the 1990s, when Pacific oyster production was at its peak, and became more widespread from 2008 onwards (Girard and Agúndez, 2014), with some mortality peaks of up to 80%. While several possible explanations have been put forward, such as pathogens global warming and pollution, multiple stress factors acting together to induce physiological disorders and metabolic disturbance remain the most probable cause (Soletchnik et al., 2007; King et al., 2019). The embryonic and larval stages of bivalves are often reported as being the most sensitive to environmental stress (Mai et al., 2012; Geffard et al., 2002; His et al., 1999). The Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), especially in early development stages, is commonly used for toxicity assessment of marine pollutants, because of its high sensitivity to a large range of pollutants, particularly pesticides (Wessel et al., 2007; Akcha et al., 2012; Mottier et al., 2013; Mai et al., 2013; Mai et al., 2014; Gamain et al., 2016). The Charente River has a vast watershed, distributed mainly over the departments of Charente and Charente-Maritime (Munaron, 2004). Agricultural activities encompass between 60 and 80% of the area, i.e. 420,000 ha (Lafargue et al., 2019). A large quantity of pesticides are used in agriculture, railway and road maintenance and private gardens representing about 4481 t of pesticides used in Charente-Maritime in 2017. Nicosulfuron and Chlortoluron are two herbicides that are regularly detected, albeit at low concentrations in the Pertuis Charentais marine environments. Nicosulfuron is mostly used in maize crops, with maximum concentrations up to 0.019 $\mu\text{g.L}^{-1}$ being detected in 2019 at the mouth of the Seudre River, next to a number of oyster farms. Chlortoluron is used mainly in wheat and barley crops. The maximum concentration of 0.14 $\mu\text{g.L}^{-1}$ was detected in 2018, at the mouth of the Charente River, close to oyster farms (Qualyse and CD17, 2020). Relatively few studies have focused on the effects of Nicosulfuron and Chlortoluron on marine species and bivalves such as oysters. In a previous study by Saglio et al. (2003), static exposures to Nicosulfuron affected gust swimming and behavioural clustering on the Goldfish, *Carassius auratus*, with concentrations ranging from 25 to 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Valiente Moro et al. (2012) observed that Chlortoluron had significant inhibitory effects on the growth of freshwater microalgae, *A. coffeaeformis*. Boscalid is a fungicide used for a variety of cereal crops, including wheat, oats and barley. It is regularly detected at the mouth of the Sevre-Niortaise River at concentrations up to 0.0097 $\mu\text{g.L}^{-1}$ in 2019 (Qualyse and CD17, 2020). Toxic effects of Boscalid were reported on the growth, photosynthesis, antioxidant system, and metabolism of *Chlorella vulgaris* (Qian et al., 2018). In addition to these three pesticides, three others widely used and frequently detected in surface waters in Europe were selected: Glyphosate, Roundup® (commercial formulation of Glyphosate) and Isoproturon. Since first appearing on the market in 1974, Glyphosate has become one of the most widely used herbicides in the world (Woodburn, 2000). In Europe, the herbicide and its metabolite Aminomethylphosphonic acid (AMPA) are frequently

detected in aquatic ecosystems, at concentrations up to 137 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Botta et al., 2009; SOS, 2010; Puértolas et al., 2010). Many commercial formulations of Glyphosate are used in domestic and agricultural weed control. The brand Roundup® contains Glyphosate formulated as an isopropylamine (IPA) salt, with a surfactant, polyoxyethylene amine (POEA), added to enhance efficiency (Tsui and Chu, 2003). Tsui and Chu (2003) showed that Roundup was more toxic than Glyphosate for the bacteria, *Vibrio fischeri* and for different aquatic plants and animal species. Since 2019, Glyphosate and Roundup have been banned for domestic use (Lucas et al., 2018) but are still used in agriculture. Charente-Maritime is the French department with the highest quantity of Glyphosate purchased, with 276 tons (0.64 kg.ha^{-1}) being sold in 2017 (INSEE, 2018). The highest concentration of Glyphosate was measured in 2020 at the mouth of the Sevre Niortaise River at 0.19 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Qualyse and CD17, 2020). Isoproturon was a widely used herbicide in agriculture (Barbash, 1999) but was banned in 2017. This herbicide was also used as algicides in paints and coatings (Luna-Acosta et al., 2012). The highest concentration of Isoproturon detected at the mouth of the Seudre River was 0.0037 $\mu\text{g.L}^{-1}$ in 2019 (Qualyse and CD17, 2020). These three pesticides (Glyphosate, Roundup and Isoproturon) have been shown to affect metabolism, spermatozoa and embryonic development of oysters (Akcha et al., 2012; Tanguy et al., 2005). While a large number of studies have investigated the effects of pesticides on marine organisms at moderate or high concentrations, toxicity data on early life stages at environmental concentrations remain scarce. In fact, these data are essential for a reliable and comprehensive assessment of the environmental risk of pesticides on marine ecosystems since embryos and larvae are the most sensitive stages in most species.

The objective of this study was first to evaluate the potential ecotoxicity of six commonly used pesticides, Glyphosate, Roundup Isoproturon, Nicosulfuron, Chlortoluron and Boscalid, on the embryo-larval development and larval swimming behaviour of *C. gigas*. Following this, toxicity thresholds were compared to environmental concentrations of pesticides to predict risk for oyster early life stages living in the Pertuis Charentais coastal area.

2. Materials and methods

2.1. Animal collection

Mature oysters (*Crassostrea gigas*, Bayne et al., 2019; Bayne et al., 2017) came from a commercial hatchery (France Naissain, France). Oysters were kept at around 4 °C and dried for two days (Bringer et al., 2020a & b). They were then acclimatised for 2 h in filtered seawater (FSW) at 18 °C before being fertilized in laboratory conditions. Spawning of oysters under controlled laboratory conditions was induced during the months of February–March 2019.

2.2. Chemicals and seawater

Reference toxicants (Glyphosate, Isoproturon, Nicosulfuron, Chlortoluron and Boscalid) and formalin were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St. Quentin Fallavier, France). Commercial solutions of Roundup GTMAX (garden weed killer, large surfaces) were purchased from a garden center. Seawater was collected from Ré Island (Pertuis Charentais, South West, France). After sampling, seawater was filtered using membrane filters of 20, 5, 1 and 0.2 μm , to eliminate debris and microorganisms (Gamain et al., 2020). Filtered seawater (FSW) was stored at 4 °C, with continuous bubbling, and was used within 7 days. A few hours before the experiment, FSW was filtered again at 0.2 μm .

CHAPITRE IV – Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryon-larvaire et pédivélégère chez l'huître creuse (*C. gigas*)

A. Bringer, H. Thomas, G. Prunier et al.

Science of the Total Environment 779 (2021) 146343

2.3. Preparation and analysis of pesticide solutions

In this present study, only the active substances of pesticides were tested except for Roundup that is one of the commercial solutions of Glyphosate. Physico-chemical properties and environmental regulatory values of the different pesticides were indicated in Table S1. For exposures, the solvent used is only seawater for well development of oyster embryos.

For our experiments, three replicates were performed for each condition tested. For the first batch of pesticides tested (Glyphosate, Roundup, and Isoproturon), three different concentrations were assayed: 0.1; 1 and 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A 10 mg.L^{-1} stock solution was prepared in Mili-Q water. For the second batch of pesticides: Nicosulfuron, Chlortoluron and Boscalid, four concentrations were tested: 0.01; 0.1; 1 and 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A stock solution at 1 mg.L^{-1} was prepared in Mili-Q water. Then the cascade dilutions (factor 10) were carried out in FSW. The concentrations tested are representative of the range of concentrations in coastal waters from the French Atlantic coast (Qualyse and CD17, 2020; Burgeot et al., 2008; Akcha et al., 2012; Soletchnik et al., 2015). The solutions were then stored at 4 °C and protected from light to prevent algal and bacterial growth. Before using the solutions, they were homogenised with a vortex.

Pesticide analysis in water was carried out using three different methods: (i) Direct injection with assay by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC/MS-MS) for the compounds Chlortoluron, Isoproturon, Nicosulfuron and Boscalid. (ii) FMOCI bypass with liquid chromatography assay coupled to tandem mass spectrometry (UPLC/MS-MS) for Glyphosate. For Roundup, the measured concentrations were expressed in μg equivalent Glyphosate per liter and the other compounds of the formulation were not analysed.

The French accreditation committee (COFRAC annex 1–1985) accredited these methods. Their accuracy was validated with a test plan based on NF T 90–210. The laboratory uses internal standards, marked with deuterium or carbon 13 to quantify the results and guarantee control of the analytical process. The accuracy of measurements is periodically checked using inter-laboratory blind testing.

2.4. Experimental design

Mature oysters were cleaned before incubation in tanks with FSW at 18 °C to avoid any external contaminations and remove organisms attached to them. Male and female oysters were induced to spawn by thermal stimulation (alternating immersion in FSW of 18 °C and 28 °C for 30 min, Mai et al., 2012; Gamain et al., 2017). Spawning males and females were individually isolated in beakers (500 mL of FSW) at their respective spawning temperatures (Parker et al., 2009). They were left undisturbed for 10 min, and then removed from their beakers. Eggs and sperm from two individuals were selected for fertilization. Sperm and eggs were sieved separately through 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 (Nikon Eclipse) at a magnification of 100 \times . In this experiment, the success of fertilization allowed us to obtain, in total, 5 males and 3 females in order to carry out all the exposures with three different couples for each condition tested. Eggs were fertilized with sperm at a ratio of 1:10 (egg:sperm). Fertilization success was verified under a microscope at 100 \times , and embryos were then counted and transferred to a 24-well microplate (Greiner Bio-One, Cellstar free of detectable DNase, RNase, human DNA and pyrogens), for embryotoxicity assays following previously published protocols (His et al., 1999; Quiniou et al., 2005) and the standardised AFNOR procedure (NF ISO 17244, 2015). Fertilized eggs (around 300–350 eggs) were exposed in wells containing 2 mL of toxicant solution and were incubated during 24 h in the dark at 24 °C to reach the D-larva stage.

2.5. Swimming speed recorded

After 24 h of incubation, swimming behaviour was recorded under a microscope (ZEISS Axio Observer Z1) with a magnification of 100 \times in light conditions according to the protocol described previously (Bringer et al., 2020a & b; Gamain et al., 2020). During analysis, D-larvae were kept at 24 °C in a dark chamber, illuminated only by weak light from the recording microscope (ZEISS Axio Observer Z1). The maximum duration of analysis was 3 h following the 24 h embryo-larval exposure. Two minute-videos were recorded (3 videos per condition and per replicate). In this experiment, a replicate corresponds to a pair of oysters (couple) having successfully achieved fertilization. Three different couples were used in this experiment. That is to say, $n = 9$ videos/condition with approximately 100 D-larvae tracked in each video. A freeware (VirtualDub, Windows) video conversion tool was used to subsample the film to 4 fps (frame per second) and convert to AVI format. ImageJ (1.52a software) was used to analyse the videos. Videos (.avi) were opened and converted to grayscale image, then converted into a binary stack of images. The wrMTrck plugin (Gamain et al., 2020) was then launched, for each video, to obtain the different swimming parameters: average speed and maximum speed recorded (pixel.s^{-1}) of each recorded D-larvae. As a result, each individual larva was assigned a number in order to identify it in the results file. The results displayed are expressed in mean \pm SEM.

2.6. Abnormal D-larvae quantification and growth

After swimming behaviour analysis, 25 μL of 1% formalin were added to each well of the microplates. To quantify abnormal D-larvae and measure their size, photographs of each well were taken at 200 \times under the ZEISS Axio Observer Z1 microscope. Abnormal D-larvae (anomalies of development, Fig. 1.a) and developmental arrest were recorded according to the criteria described in the standardised AFNOR procedure (NF ISO 17244, 2015). For the analysis and quantification of larval malformations, two types of malformations were taken into account: shell anomalies (concave hinge and indentation) and mantle anomalies (retracted mantle and mantle hypertrophy with expulsion). Validation of the bioassay implies that the control conditions (in FSW without pesticides) contain less than 20% of abnormal larvae (NF ISO 17244, 2015). Three different couples were used and four technical replicates were performed for each condition. Altogether, twelve replicates with approximately 200 D-larvae each were analysed for each condition. The results are expressed as mean \pm SEM. A biometric analysis was then carried out using the ImageJ application to measure the length of 24 h-old D-larvae. Each larva (Fig. 1.b) was oriented and aligned to take a photo at 200 \times under a microscope (ZEISS Axio Observer Z1) and a line was drawn lengthwise (Fig. 1.c) using ImageJ (Talmage and Gobler, 2009; Helm et al., 2006; Bringer et al., 2020b). Three different couples were used, with a total of $n = 20$ D-larvae analysed per condition. The results are expressed as mean \pm SEM.

2.7. Comparison of pesticide toxicity and environmental risk assessment

As a first step, the LOECs (Lowest Observed Effect Concentration) were determined for each parameter analysed and for each compound tested. The relevant LOEC of each pesticide is the lowest LOEC value corresponding to the most sensitive endpoint. Following this, a comparison of LOEC values and spectrum of toxic effects was made to rank the compounds tested according to their toxicity. Finally, environmental risk assessment was performed by comparing the relevant LOEC with the maximum and average environmental concentrations recorded in surface marine water in the Pertuis Charentais (SW, France). Only chemical data for surface waters close to oyster-growing areas, (Fig. S2) during summers 2018 to 2020

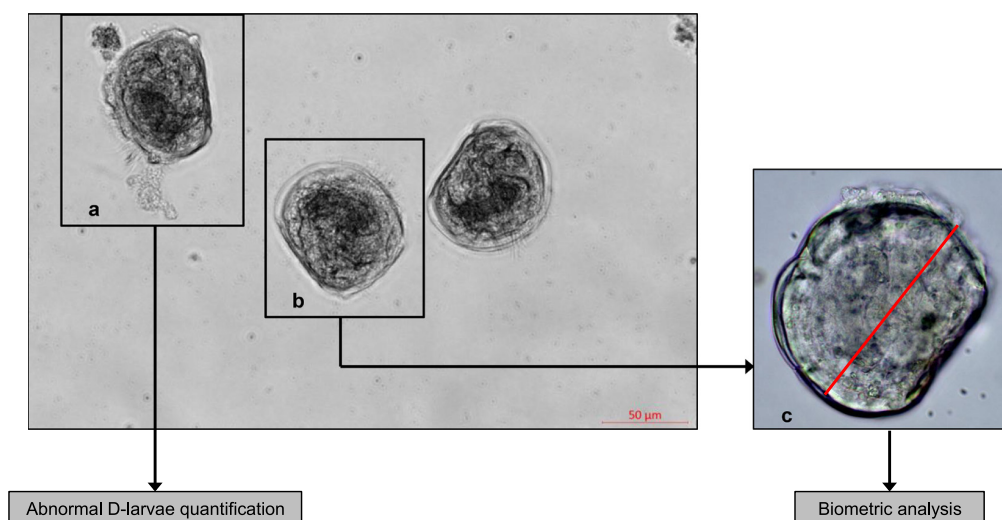


Fig. 1. Micrographs of *C. gigas* D-larvae (ZEISS Axio Observer Z1, 100×). (a) D-larva with developmental anomalies; (b) D-larva micrograph selected for biometric analysis and (c) micrograph zoom for D-larva length measurement using ImageJ software (red line represent the length measurement). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

were selected (June to September period, [Qualyse and CD17, 2020](#)). Summertime is the normal spawning season for Pacific oyster along the French Atlantic coasts. To predict environmental risk, two risk quotients were calculated for each compound: $RQ_1 = C_{max}/LOEC$ and $RQ_2 = C_{avg}/LOEC$, with C_{max} (maximum concentration in the Pertuis Charentais zone) and C_{avg} (average concentration in the Pertuis Charentais zone). RQ_1 represents acute environmental risk during a pollution peak (spreading period of pesticides) while RQ_2 represents chronic environmental risk associated to chronic exposure to low or moderate levels of pesticides.

2.8. Statistics

All data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The statistical analysis was conducted using R. Homogeneity of variance (Levene test) and normality of distribution (Shapiro-Wilk test) were also tested. To compare the various treatments, an analysis of variance (ANOVA) using Tukey post-hoc test was performed. For data outside the scope of a parametric test, statistical analysis was carried out through the Kruskal-Wallis Test. Differences in tested concentration means were then assessed using the Kruskal Nemenyi Post-hoc test with the PMCMR package (the Tukey test equivalent for non-parametric data). For the calculation of EC_{50} , the Hill's method was applied and the "drc" package on R was used ([Ritz et al., 2015](#)). EC_{50} could not be determined for all the parameters studied due to the lack of effect or a weak effect of the compound on the specific parameter. When $p < 0.05$, significance was accepted.

3. Results and discussion

In the present study, we focused on the toxic effects and risk assessment of six widely used pesticides, Roundup, Glyphosate, Isoproturon, Nicosulfuron, Chlortoluron and Boscalid on early life stage of Pacific oyster from the Pertuis Charentais area. Four main endpoints were analysed at the end of the 24 h-exposure: (1) development arrest defects, (2) malformations (3) growth and (4) swimming activity of early life stages of bivalves (*C. gigas*).

Pesticides may contribute to summertime spikes in the mortality of spat and adult oysters as an additional stressor ([Mottier et al., 2013](#))

since the reproduction and the development of oyster take places in summer along the French coasts.

3.1. Exposure solution analysis

Analyses were conducted to determine the true concentrations of the different solutions prepared for the pesticides tested in our experiments. We can observe that Glyphosate, Isoproturon, Nicosulfuron and Chlortoluron measured concentrations were very close to theoretical concentrations ([Table 1](#)). With regard to Roundup, the concentration measured is three times higher than the theoretical concentration ([Table 1](#)). The Roundup concentration is expressed in Glyphosate equivalent. For Roundup, we can therefore assume that the concentrations tested are significantly higher than the theoretical experimental concentrations. For Boscalid, the measured concentrations are much lower than the targeted concentrations ([Table 1](#)). This can be explained by the fact that this substance is relatively hydrophobic ($\log Kow = 2.96$) and can adsorb on the plastic container. In the rest of the paper, the real concentrations assayed will be displayed and not the theoretical experimental concentrations.

3.2. Effects of pesticides on oyster embryo-larval development

For all the experiments, the baselines for malformations and developmental arrests in control larvae were $10.4 \pm 1.2\%$ and $6.9 \pm 0.9\%$ respectively. For the six pesticides tested, we observed a marked increase in both developmental arrest and malformed larvae with increasing exposure to the compounds. This effect was significant at the first tested

Table 1
Theoretical and measured concentrations of the different pesticides tested.

Pesticides (stock solution)	Theoretical (mg.L ⁻¹)	Measured (mg.L ⁻¹)
Roundup ^a	10	30
Glyphosate	10	11
Isoproturon	10	7.8
Nicosulfuron	1	1.7
Chlortoluron	1	1.5
Boscalid	1	0.28

^a For Roundup the concentration is in µg equivalent glyphosate per liter.

CHAPITRE IV – Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryo-larvaire et pèdivéligère chez l'huître creuse (*C. gigas*)

A. Bringer, H. Thomas, G. Prunier et al.

Science of the Total Environment 779 (2021) 146343

concentration for Roundup and Glyphosate (respectively 0.3 and 0.11 $\mu\text{g.L}^{-1}$, Fig. 2.A & B). For Roundup, we observed a dose-response effect, with an increase in larval malformations depending on the concentration tested. Mottier et al. (2013), showed that Roundup had effects on the larval development of the oyster, *C. gigas*, at higher concentrations (approximately 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) than those tested in this present study. A drastic impact of Roundup exposure on embryo-larval development was observed between 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 10,000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ for both Roundup formulations tested (Mottier et al., 2013). In the study of Mottier et al. (2013), Roundup was found to be more toxic than the active substance Glyphosate. In our study, Roundup induced a dose-response effect on larval development and appeared more toxic

than Glyphosate to oyster D-larvae. However, the chemical analyses carried out on the stock solution of Roundup (Table 1) indicated that the measured concentration of glyphosate was much higher than the theoretical target value. Akcha et al. (2012) showed effects of Glyphosate on embryo-larval development (*C. gigas*) at concentrations of 2.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, a higher concentration than the LOEC calculated in the present work. For Isoproturon, the effect on oyster development was less pronounced than for the other pesticides tested, with malformation rates significantly greater than the condition control, at concentrations above 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Fig. 2.C). His and Seaman (1993) found that the strongest effects for Isoproturon were observed for the survival and growth

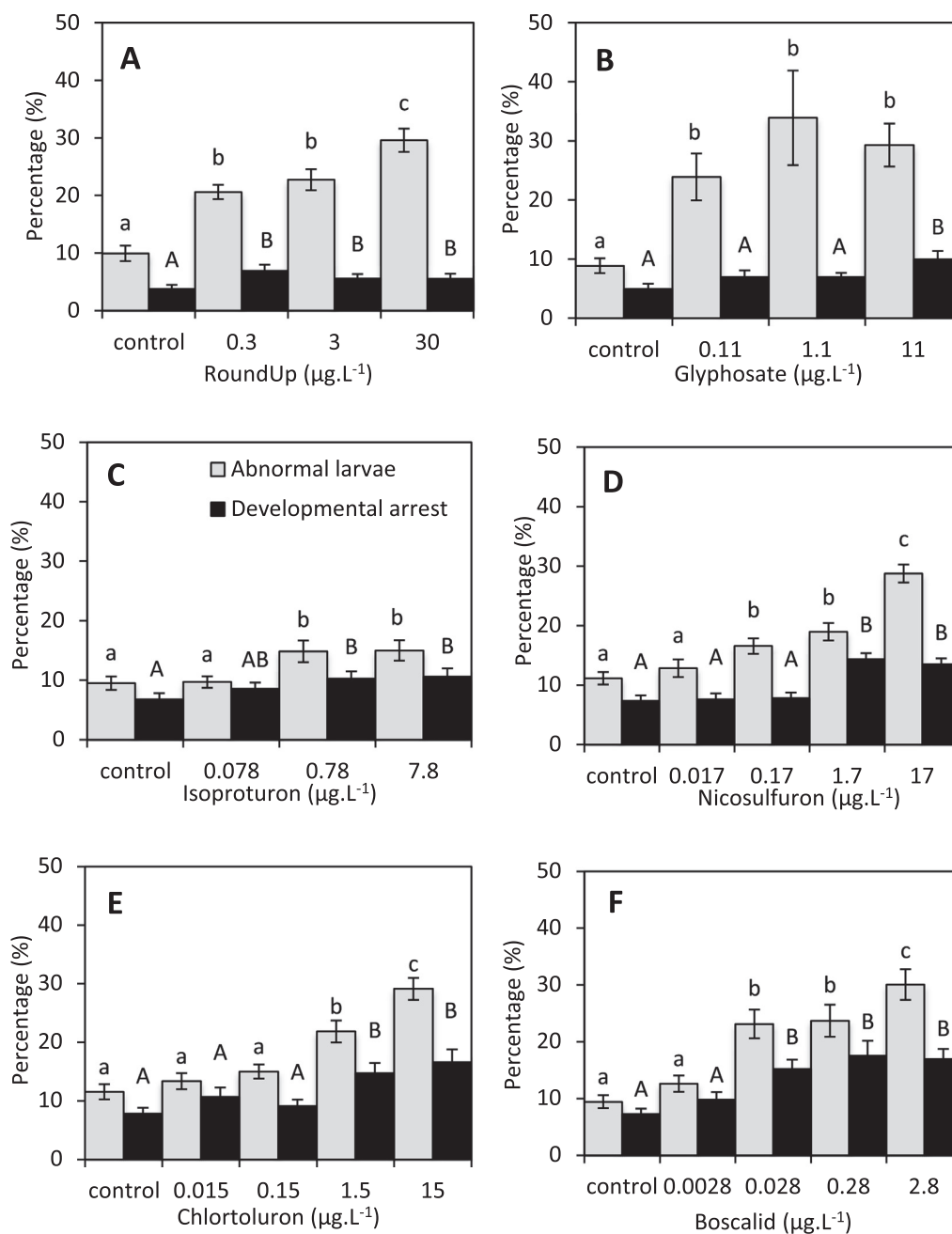


Fig. 2. Abnormal D-larvae (%) and developmental arrest (%) of *C. gigas*, after 24-h exposure to different concentrations of Roundup (A); Glyphosate (B); Isoproturon (C); Nicosulfuron (D); Chlortoluron (E) and Boscalid (F). Values are mean \pm SEM for three replicates per treatment. Different letters indicated significant differences between different concentrations ($p < 0.05$) with Kruskal-Wallis and Nemenyi tests ($n = 3$ replicates/conditions).

CHAPITRE IV – Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryonnaire et pédivélégère chez l'huître creuse (*C. gigas*)

A. Bringer, H. Thomas, G. Prunier et al.

Science of the Total Environment 779 (2021) 146343

of *C. gigas* larvae at 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Luna-Acosta et al. (2012) showed that a mixture of pesticides containing Isoproturon (concentration of 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$) had early effects on *C. gigas* oyster spat, plasmatic enzyme activity, and haemocytic phagocytosis activity.

Developmental effects are significantly stronger for Nicosulfuron and Boscalid from, respectively 0.17 and 0.028 $\mu\text{g.L}^{-1}$ with 16.6 ± 1.5 and $23.1 \pm 2.8\%$ respectively (Fig. 2.D & F). Concerning Chlortoluron, the effects are significant from 1.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ with $21.8 \pm 1.9\%$ of larvae

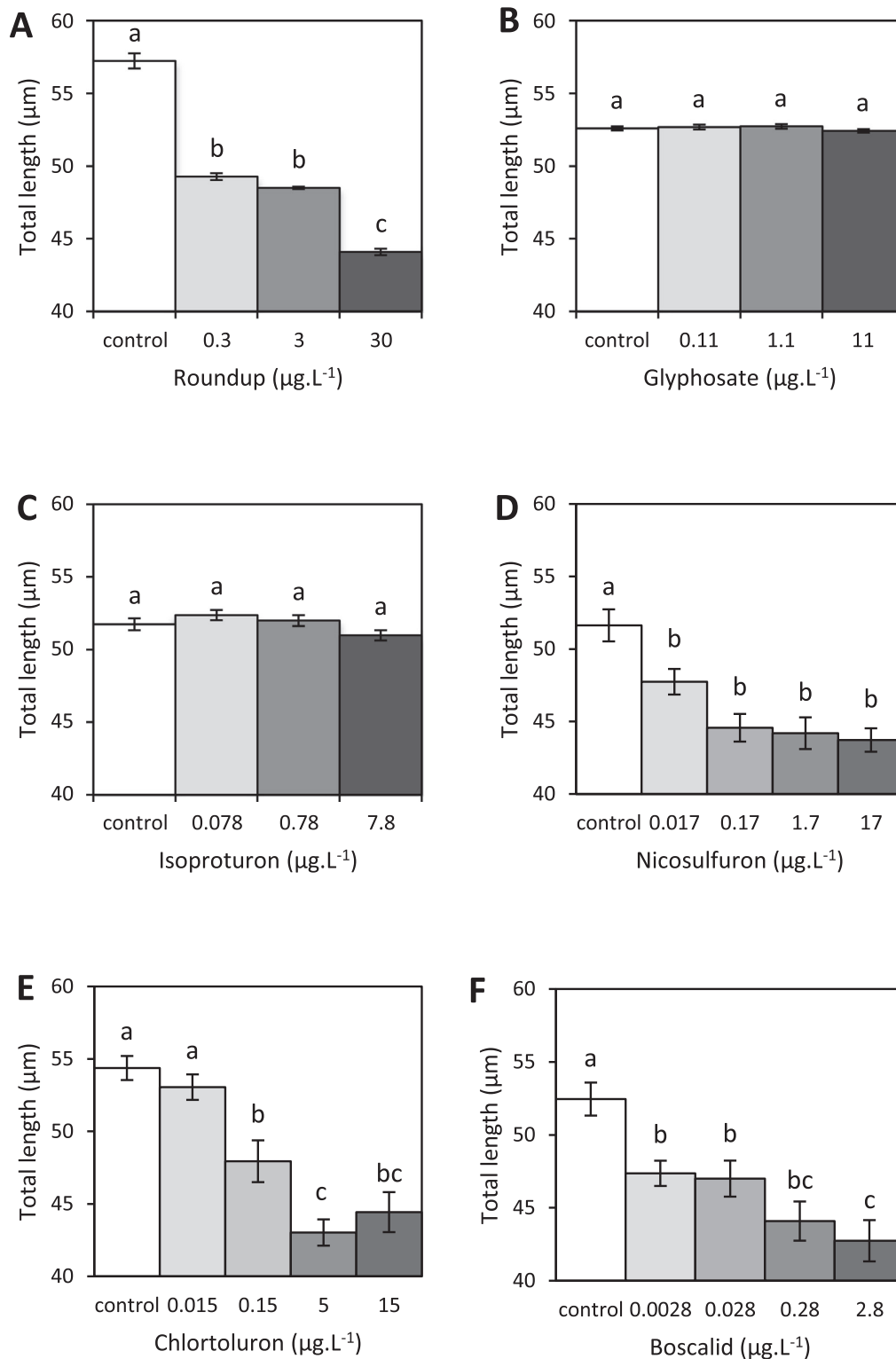


Fig. 3. Larva total length (μm) of *C. gigas* after 24-h exposure to different concentrations of Roundup (A); Glyphosate (B); Isoproturon (C); Nicosulfuron (D); Chlortoluron (E) and Boscalid (F). Values are means \pm SEM. Different letters indicated significant differences between different concentrations ($p < 0.05$) with ANOVA and Tukey test ($n = 3$ replicates/condition).

malformed (Fig. 2.E). Previous studies (Mottier et al., 2013; Akcha et al., 2012) have shown that herbicides can contribute to abnormal development of D-larvae (*C. gigas*). Mai et al. (2012) and Gamain et al. (2016) reported developmental anomalies following exposure to Metolachlor at 0.01 $\mu\text{g.L}^{-1}$. In the work of Behrens et al. (2016), malformation rates of 38.2% were observed following exposure of early life stages of oyster (*C. gigas*) to Diuron at 0.05 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Metolachlor and Diuron are weed killer herbicides like Chlortoluron.

In the present study, Roundup showed significantly higher levels of developmental arrest (DA) at all concentrations tested when compared to control (Fig. 2.A). Glyphosate had an effect at 11 $\mu\text{g.L}^{-1}$ with 9.9 \pm 1.4% of DA (Fig. 2.A) and Isoproturon at 0.78 $\mu\text{g.L}^{-1}$ with 10.3 \pm 1.2% (Fig. 2.C). Nicosulfuron and Chlortoluron showed a similar effect on DA with a significant increase from, respectively 1.7 and 1.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Fig. 2.D & E). Boscalid had an effect on DA from 0.028 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Fig. 2.F). In the study conducted by Gamain et al. (2016), the effects of S-Metolachlor on development were observed from 0.01 $\mu\text{g.L}^{-1}$. In a previous study (Mai et al., 2013), Diuron, Irgarol and S-Metolachlor induced embryotoxic effects on oyster larvae at concentrations close to those found in Atlantic coastal areas.

3.3. Effects of pesticides on oyster embryo-larval growth

Average total length of larvae in the controls was 53.1 \pm 0.9 μm (mean \pm SEM). No effects on total length for oyster D-larvae were observed for Glyphosate and Isoproturon compounds (Fig. 3.B & C). In contrast, Roundup showed a dose response effect, with a decrease in larval size when compared to control conditions from the first concentration tested (0.3 $\mu\text{g.L}^{-1}$, Fig. 3.A). Previous studies have reported that chronic exposure to Roundup can affect fitness markers (e.g. shell growth, CI and reproduction) in oyster spat (Séguin et al., 2017). Similar effects were observed in the study of Asnicar et al. (2020) where sea urchin larvae (*P. lividus*) exposed to Glyphosate, AMPA and Roundup for 48 h, showed reduced growth at concentrations from 1 to 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A dose-dependent reduction in larval size was also observed following exposure to Nicosulfuron, Chlortoluron and Boscalid. We observed a significant reduction of growth at 0.017 $\mu\text{g.L}^{-1}$ for Nicosulfuron with a size of 47.7 \pm 0.9 μm (Fig. 3.E), at 0.15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ for Chlortoluron with a size of 47.9 \pm 1.4 μm (Fig. 3.F) and at 0.0028 $\mu\text{g.L}^{-1}$ for Boscalid with a size of 47.4 \pm 0.9 μm (Fig. 3.G).

The growth of D-larvae after 24 h of development was delayed for four of the six pesticides tested. Delayed growth in oyster larvae was previously reported following exposure to mercury (Beiras and His, 1994) or zinc (Brereton et al., 1973). In our study, Boscalid showed the greatest effect on larval growth. Data on the effects of Boscalid on the early life stages of invertebrates are scarce, but such toxic effects have been recently reported in zebrafish, *Danio rerio*, embryos (Qian et al., 2018). In this previous study, sublethal developmental toxicity and cell apoptosis induction were reported in zebrafish embryos. Boscalid is a fungicide that can mitochondrial respiration on complex II (Pasche et al., 2005) and therefore can potentially impair the production of ATP and the energy available for the development and growth of marine organisms. Boscalid is considered moderately to highly toxic to freshwater invertebrates, moderately toxic to fish and algae, but highly toxic to marine bivalves (Pest Management Regulatory Agency, 2004; Aubee and Lieu, 2010a, 2010b). In the latter studies (Aubee and Lieu, 2010a, 2010b), it was shown that Boscalid can have adverse effects on the survival, growth and/or fecundity of aquatic animals (estuarine/marine fish and invertebrates).

3.4. Effects of pesticides on the swimming activity of oyster larvae

A protocol to analyse swimming activity in oyster D-larvae has recently been developed (Gamain et al., 2020; Bringer et al., 2020a, 2020b). Swimming activity is an integrated marker of the effects of pollutants on different biological functions. Disrupted swimming activity

can also have consequences on survival, fitness, larval dispersal and colonization of new habitats (Gamain et al., 2020).

For the maximum swimming speed recorded in the control larvae of the six experiments, the mean value (mean \pm SEM) is 163.3 \pm 11.5 $\mu\text{m.s}^{-1}$. Glyphosate had no effect on maximum swimming speed (Fig. 4.B). For Isoproturon, there was a significant increase in swimming speed for larvae exposed to 0.78 and 7.8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ with respectively 195 \pm 8.7 and 179 \pm 9.3 $\mu\text{m.s}^{-1}$ (Fig. 4.C). For the other compounds, e.g. Roundup, Nicosulfuron, Chlortoluron and Boscalid, a similar trend was observed with a significant decrease of maximum speed with increasing pesticide concentrations (Fig. 4) except for Boscalid at 2.8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Fig. 4.G). Roundup showed a decrease in the maximum swimming speed at 3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ with a speed of 125.2 \pm 8.2 $\mu\text{m.s}^{-1}$ (Fig. 4.A). For Nicosulfuron, Chlortoluron and Boscalid, a decrease in swimming speed was observed from the first concentration tested (respectively 0.017, 0.015 and 0.0028 $\mu\text{g.L}^{-1}$) with swimming speeds of 104.8 \pm 10.3, 89.3 \pm 15.4 and 123.7 \pm 12.7 $\mu\text{m.s}^{-1}$, respectively (Fig. 4.D, E & F).

Based on our results, Glyphosate did not affect the swimming behaviour of oyster D-larvae. However, Roundup affected swimming speed. This result is consistent with past studies showing that Roundup had a greater toxic effect than Glyphosate, albeit based on different parameters (Mottier et al., 2013). In view of the innovative nature of the analysis of swimming activity in oyster larvae, few studies have examined the swimming behaviour of D-larvae exposed to pesticides. Weeks-Santos et al. (2019) showed that the rainbow trout larvae (*Oncorhynchus mykiss*) had greater mobility when exposed to Glyphosate. Gamain et al. (2020) reported that S-Metolachlor significantly affects swimming behaviour in oyster D-larvae, particularly swimming trajectories. We also demonstrated in two recent studies that other organic pollutants such as microplastics can alter the swimming behaviour of larvae (*C. gigas*), particularly their swimming speed and trajectories (Bringer et al., 2020a & b). A decrease in swimming speed of D-larvae is likely associated with developmental malformations (Gamain et al., 2020), but may also be related to effects on energetic metabolism and neuromuscular activity. This swimming behavioural effect could affect larval survival, dispersion and fixation.

3.5. Comparison of pesticide toxicity and risk assessment for oyster larvae living in the Pertuis Charentais

Table 2 presents the different LOECs deduced from our experimental data for the various endpoints and pesticides tested. In addition, the relevant LOEC for each compound was highlighted. In supplementary data, Table S2 represents EC₅₀ for each pesticides and endpoints.

The maximum and average concentrations ($\mu\text{g/L}$) of each pesticide in the marine area of the Pertuis Charentais (Fig. S1) are indicated in Table 3 as well as the environmental risk quotients (RQ₁ and RQ₂) for summer period (June to September) during 2018–2020.

For Glyphosate and Roundup (Roundup being expressed in this work in Glyphosate equivalent), a maximum concentration of 0.19 $\mu\text{g.L}^{-1}$ was measured in 2020, during the beginning of the summer period, with an average concentration of 0.022 $\mu\text{g.L}^{-1}$, at the mouth of the Sevre Niortaise River, next to oyster's farms. For Isoproturon, a maximum and average detected concentration of 0.001 $\mu\text{g.L}^{-1}$ was recorded at the mouth of the Sevre Niortaise in marine ecosystem. Nicosulfuron was detected at a maximum and average concentration of 0.008 (end of June 2018) and 0.003 $\mu\text{g.L}^{-1}$ at the mouth of the Seudre River, next to oyster's farms. For Chlortoluron and Boscalid, there are, respectively, maximum concentrations of 0.14 (early summer 2018) at the mouth of the Charente River in oyster's farming area and 0.005 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (early summer 2020) at the mouth of the Sevre Niortaise River (Table 2). Average concentrations for Chlortoluron and Boscalid were 0.001 and 0.003 $\mu\text{g.L}^{-1}$. In the study conducted by Moreau et al. (2014), no significant toxic effects of the 4 different pesticides groups (herbicides, fungicides, insecticides and molluscicides) tested (mixture of 14 pesticides including Glyphosate, Diuron, AMPA, Metaldehyde and Tebuconazol) were

CHAPITRE IV – Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryonnaire et pédivéligne chez l'huître creuse (*C. gigas*)

A. Bringer, H. Thomas, G. Prunier et al.

Science of the Total Environment 779 (2021) 146343

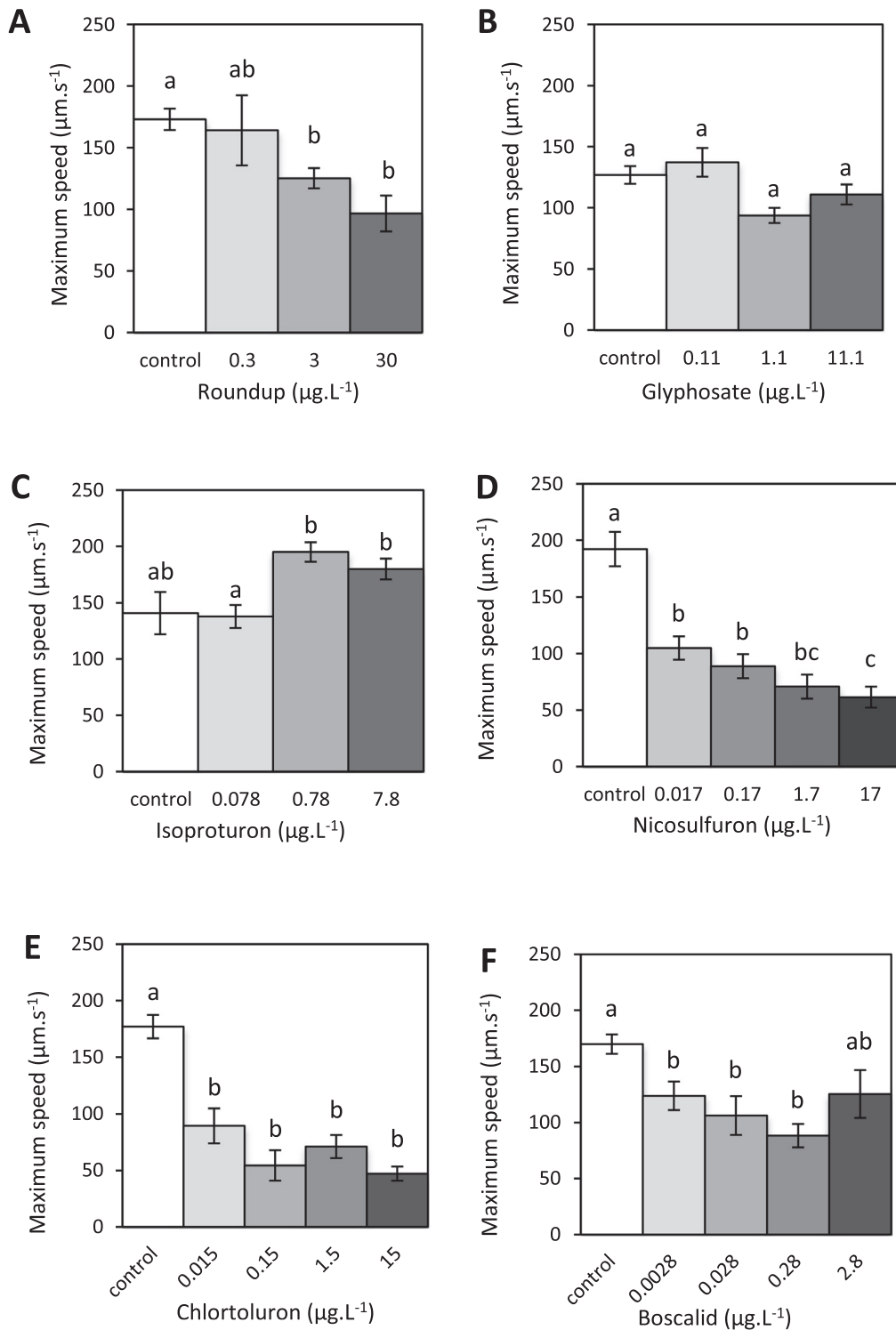


Fig. 4. Maximum swimming speed recorded ($\mu\text{m.s}^{-1}$) in oyster D-larvae, *C. gigas* after 24-h exposure to different concentrations of Roundup (A); Glyphosate (B); Isoproturon (C); Nicosulfuron (D); Chlortoluron (E) and Boscalid (F). Values are means \pm SEM for three replicates per treatment. Different letters indicated significant differences between different concentrations ($p < 0.05$) with Kruskal-Wallis and Nemenyi test ($n = 3$ replicates/conditions).

detected *in vitro* on oyster haemocytes. The early life stages of bivalves are much more sensitive to chemicals than juveniles or adults (Mai et al., 2012; Mottier et al., 2013; Tallec et al., 2018; Sussarellu et al., 2016). In view of the relevant LOEC (Table 2), and based on the most

sensitive endpoints analysed on *C. gigas* larvae, we can rank the hazard toxicity of the six pesticides tested as follow, Boscalid > Chlortoluron = Nicosulfuron > Glyphosate > Roundup > Isoproturon. However, when we ranked the toxicity of compounds according to their EC_{50}

CHAPITRE IV – Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryo-larvaire et pédivéligère chez l'huître creuse (*C. gigas*)

A. Bringer, H. Thomas, G. Prunier et al.

Science of the Total Environment 779 (2021) 146343

Table 2

LOEC values obtained for the different endpoints and the different pesticides analysed. The values in bold correspond to the relevant LOEC.

Endpoints Pesticides	Developmental arrest	Development anomalies	Growth	Swimming speed
Roundup ^a	0.3	0.3	0.3	3
Glyphosate	11	0.11	>11	>11
Isoproturon	0.78	0.78	>7.8	>7.8
Nicosulfuron	1.7	0.17	0.017	0.017
Chlortoluron	1.5	1.5	0.15	0.015
Boscalid	0.028	0.028	0.0028	0.0028

^a For Roundup the concentration is in µg equivalent glyphosate per liter.

(Table S2), the ranking is different for Glyphosate: Boscalid > Chlortoluron > Nicosulfuron > Roundup > Isoproturon > Glyphosate. This discrepancy is probably due to the uncertainties in the calculation of the EC₅₀ and LOEC for glyphosate due to the small amount of data available.

The fungicide Boscalid seems to be particularly toxic for the larval stage of *C. gigas*. Boscalid was also shown to negatively affected survival, growth, and other energy reserves of amphipods (*Allorchesthes compressa*), and the effects were concentration-dependent (Vu et al., 2016). The significant effects caused by the herbicides Nicosulfuron and Chlortoluron could come from their chemical makeup, namely organochlorine and sulfur molecules. According to the average and maximum concentrations and the LOEC of each compound, we predicted the environmental risk for early life stages of oysters living in the Pertuis Charentais coastal area. For the acute environmental risk associated with contamination peaks at summer period, the following ranking is highlighted: Chlortoluron > Boscalid > Glyphosate > Roundup > Nicosulfuron > Isoproturon. Chlortoluron has the highest acute risk quotient RQ₁ of 9.3 (Table 3). Boscalid and Glyphosate have intermediate RQ₁ of 1.79 and 1.73 while Roundup, Nicosulfuron and Isoproturon have a much lower risk, with RQ₁ value of 0.63, 0.47 and 0.001, respectively. Chlortoluron is the herbicide compound found at highest concentration in the marine ecosystems of Pertuis Charentais, at the mouth of a Charente river and near oyster-farming areas. In addition, it is ranked

Table 3

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) obtained for each pesticides tested for the most sensibility endpoints effects. And RQ calculations (RQ₁ = C_{max}/LOEC and RQ₂ = C_{avg}/LOEC), with C_{max} (maximal concentration in µg.L⁻¹) and C_{avg} (average concentration in µg.L⁻¹) detected in the marine areas of Pertuis Charentais during summer period (Qualyse and CD17, 2020) and prediction for environmental risk.

Pesticides	Relevant	C _{max}	C _{avg}	RQ ₁	RQ ₂
	LOEC	(µg/L)	(µg/L)		
Roundup	0.3	0.19	0.02	0.63	0.07
Glyphosate	0.11	0.19	0.02	1.73	0.18
Isoproturon	0.78	0.001	0.001	0.001	0.001
Nicosulfuron	0.017	0.008	0.003	0.47	0.18
Chlortoluron	0.015	0.14	0.001	9.3	0.07
Boscalid	0.0028	0.005	0.003	1.79	1.07

* For Roundup the concentration is in µg equivalent glyphosate per liter

Environmental risk	No or low risk	Moderate	High
RQ values	RQ ₁ or RQ ₂ < 1	1 ≤ RQ ₁ or RQ ₂ < 5	RQ ₁ or RQ ₂ ≥ 5

first, in this study, in terms of level of toxicity. According to our results, Chlortoluron poses a high risk to oyster early life stages, and water concentrations should be regularly monitored in the Pertuis Charentais especially in summer during the spawning season of oyster. A second risk assessment for chronic exposure was also performed with concentrations averaged over 2018–2020 summer period. This leads to the following ranking: Boscalid > Nicosulfuron = Glyphosate > Chlortoluron = Roundup > Isoproturon. However, there is not a significant risk associated to the chronic exposure to these pesticides in the Pertuis Charentais, except for the Boscalid with a moderate RQ₂ of 1.07. Our risk assessment approach is based on isolated compounds. This does not mimic realistic environmental conditions since pesticides are currently detected in mixture and associated to other pollutants. For a better environmental risk assessment, future studies should focus on the effects of environmental mixtures of these emerging contaminants and should associate others human-driven stressors.

4. Conclusion

Based on the results of the present study, authors can assert that *C. gigas* embryo-larval development and survival are strongly affected by acute exposure to a wide range of pesticides. Larval growth was significantly reduced following exposure to all the studied pesticides, except Glyphosate and Isoproturon. In addition, the maximum swimming speed of oyster larvae decreased in the presence of pesticides, except for Glyphosate and Isoproturon. Nicosulfuron, Chlortoluron and Boscalid induced effects from the first tested concentrations (concentrations close to environmental ones) with a decrease in the swimming speed of the D-larvae. Behavioural and developmental anomalies could have longer-term effects on the larvae's ability to feed, colonise new habitats, and attach themselves to the substrate. In view of the acute risk quotient obtained for each compound, it can be asserted that Chlortoluron represent a threat for the marine ecosystem and especially for early life stages of oysters produced in the Pertuis Charentais area and should be carefully monitored specially during spring and summer. In view of the results of this present study, it seems important to study Boscalid that shows effects at concentrations close to the natural environment. Glyphosate also represent a moderate risk for early stages of bivalves, and remain to be monitored. The results obtained in this study will not only improve knowledge but also support future regulations on pesticides in order to improve water quality and putatively oyster farming in coastal environments.

CRediT authorship contribution statement

Arno Bringer: Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Writing – original draft, Visualization, Funding acquisition. **Hélène Thomas:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Grégoire Prunier:** Formal analysis, Resources. **Emmanuel Dubillot:** Methodology, Resources. **Christelle Clérandeau:** Methodology, Resources. **Marius Pageaud:** Formal analysis, Methodology. **Jérôme Cachot:** Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Writing – review & editing, Supervision, Project administration.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Arno Bringer was the recipient of a PhD grant (Comité Régional de la Conchyliculture de la Charente-Maritime CRC17) and financial support

CHAPITRE IV – Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryo-larvaire et pédivélégère chez l'huître creuse (*C. gigas*)

A. Bringer, H. Thomas, G. Prunier et al.

Science of the Total Environment 779 (2021) 146343

for the Région Nouvelle Aquitaine and Comité Départemental de la Charente Maritime (CD17) to carry out this research. Our thanks go to the AQUAECOs (Amélioration de la QUALité Environnementale sur les zones Conchylicoles des Pertuis Charentais) project funded by partnership CRC17 and OFB (French Biodiversity Office). La Rochelle University, the University of Bordeaux, and the Centre National de la Recherche Scientifique (France) also funded this study. We also thank the Qualyse laboratory for its analytical expertise and for environmental data transmitted in agreement with Department 17 on their monitoring program for oyster-growing areas. The authors would also like to thank France Naissain for providing the oyster genitor specimens and James Emery for his English proofreading services.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146343>.

References

- Akcha, F., Spagnol, C., Rouxel, J., 2012. Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquat. Toxicol.* 106, 104–113.
- Asnicar, D., Cappelli, C., Sallehuddin, A.S., Maznan, N.A., Marin, M.G., 2020. Effects of glyphosate-based and derived products on sea urchin larval development. *Journal of Marine Science and Engineering* 8 (9), 661.
- Aubee, C., Lieu, D., 2010a. Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for Boscalid New Use on Rapeseed, Including Canola (Seed Treatment) (U.S. EPA - Washington).
- Aubee, C., Lieu, D., 2010b. Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for Boscalid New Uses on Alfalfa and Citrus (Group 10) (U.S. EPA - Washington).
- Aubertot, J.N., Barbier, J.M., Carpentier, A., Grill, J.J., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., Savini, I., Volz, M., 2005. Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter les impacts environnementaux. Expertise scientifique collective INRA Cemagref 64 pp.
- Barbash, J.E., 1999. Distribution of major herbicides in ground water of the United States 98. US Department of the Interior, US Geological Survey No. 4245.
- Bayne, B.L., Ahrens, M., Allen, S.K., D'auriac, M.A., Backeljau, T., Beninger, P., Bohn, R., Boudry, P., Davis, J., Green, T., Guo, X., Hedgecock, D., Ibarra, A., Kingsley-Smith, P., Krause, M., Langdon, C., Lapègue, S., Li, C., Manahan, D., Mann, R., Perez-Paralle, L., Powell, E.N., Rawson, P.D., Speiser, D., Sanchez, J.-L., Shumway, S., Wang, H., 2017. The proposed dropping of the genus *Crassostrea* for all pacific cupped oysters and its replacement by a new genus *magallana*: a dissenting view. *J. Shellfish Res.* 36 (3), 545–548.
- Bayne, B., d'Auriac, M.A., Backeljau, T., Beninger, P., Boudry, P., Carnegie, R., ... Langdon, C., 2019. A scientific name for Pacific oysters. *Aquaculture* 499, 373.
- Behrens, D., Rouxel, J., Burgeot, T., Akcha, F., 2016. Comparative embryotoxicity and genotoxicity of the herbicide diuron and its metabolites in early life stages of *Crassostrea gigas*: implication of reactive oxygen species production. *Aquat. Toxicol.* 175, 249–259.
- Beiras, R., His, E., 1994. Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival, growth and metamorphosis of *Crassostrea gigas* oyster larvae. *Marine Ecology Progress Series* 95–103.
- Botta, F., Lavison, G., Couturier, G., Alliot, F., Moreau-Guigon, E., Fauchon, N., Guery, B., Chevrel, M., Blanchoud, H., 2009. Transfer of glyphosate and its degraded AMPA to surface waters through urban sewerage systems. *Chemosphere* 77, 133–139.
- Brereton, A., Lord, H., Thornton, I., Webb, J.S., 1973. Effect of zinc on growth and development of larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 19 (2), 96–101.
- Brethead, S., Toutant, J.P., Saglio, P., 2000. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47 (2), 117–124.
- Bringer, A., Cachot, J., Prunier, G., Dubillot, E., Clérandeau, C., Thomas, H., 2020a. Experimental ingestion of fluorescent microplastics by pacific oysters, *Crassostrea gigas*, and their effects on the behaviour and development at early stages. *Chemosphere* 126793.
- Bringer, A., Thomas, H., Prunier, G., Dubillot, E., Bossut, N., Churlaud, C., Clérandeau, C., Le Bihanic, F., Cachot, J., 2020b. High-density polyethylene (HDPE) microplastics impair development and swimming activity of Pacific oyster D-larvae, *Crassostrea gigas*, depending on particle size. *Environ. Pollut.* 113978.
- Burgeot, T., Gagnaire, B., Renault, T., Haure, J., Moraga, D., David, E., Boutet, I., Sauriau, P.G., Malet, N., Bouchet, V., Le Roux, A., Lapègue, S., Bouilly, K., Le Moullac, G., Arzul, G., Knoery, J., Quiniou, F., Barcher, C., Soletchnick, P., 2008. Oyster summer mortality risks associated with environmental stress. In: Samain, J.F., McCom-bie, H. (Eds.), Summer Mortality of Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. The Mores project. Éd. Ifremer/Quae, pp. 107–151.
- CNC (Comité National de la Conchyliculture), 2020. Les statistiques. www.cnc-france.com. (Accessed October 2020).
- CNC (Comité National de la Conchyliculture), 2016. <http://www.cnc-france.com/La-Production-francaise.aspx>. (Accessed July 2019).
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Pardon, P., Tapie, N., Gourves, P.Y., ... Morin, B., 2016. Combined effects of pollutants and salinity on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 113, 31–38.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Clérandeau, C., Mazzella, N., Gourves, P.Y., Morin, B., 2017. Combined effects of temperature and copper and S-metolachlor on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Pollut. Bull.* 115 (1–2), 201–210.
- Gamain, P., Roméro-Ramirez, A., Gonzalez, P., Mazella, N., Gourves, P.-Y., Campan, C., Morin, B., Cachot, J., 2020. Assessment of swimming behavior of the Pacific oyster D-larvae (*Crassostrea gigas*) following exposure to model pollutants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27 (4), 3675–3685.
- 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.
- Girard, S., Agúndez, J.A.P., 2014. The effects of the oyster mortality crisis on the economics of the shellfish farming sector: preliminary review and prospects from a case study in Marennes-Oleron Bay (France). *Mar. Policy* 48, 142–151.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2006. Hatchery operation: culture of larvae basic methodology, feeding and nutrition, factors influencing growth and survival, and settlement and metamorphosis. Hatchery culture of bivalves: A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper 471.
- His, E., Seaman, M.N.L., 1993. Effects of Twelve Pesticides on Larvae of Oysters (*Crassostrea gigas*) and on Two Species of Unicellular Marine Algae (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*). *Int. Counc. Exploration, Sea, ICES-CM*, Copenhagen, Denmark 22 pp.
- His, E., Beiras, R., Seaman, M.N.L., Southward, A.J., P.A.T., Young, C.M., 1999. The assessment of marine pollution-bioassays with bivalve embryos and larvae. *Adv. Mar. Biol.* 37, 1–178.
- INSEE, November 13, 2018. BNV-D, sales data to the INSEE common code of distributors, extracted on. Processing: SDES, 2019. https://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/sites/default/files/2019-07/datalab-essentiel-172-traduction-anglaise-plan%20de%20reduction-avril2019_0.pdf.
- King, W.L., Jenkins, C., Go, J., Siboni, N., Seymour, J.R., Labbate, M., 2019. Characterisation of the Pacific oyster microbiome during a summer mortality event. *Microb. Ecol.* 77 (2), 502–512.
- Lafargue, I., Balan, S., Bonotoux, J., Guicheney, H., 2019. Agriculture, agroalimentaire, pêche, conchyliculture: des enjeux forts pour la Charente-Maritime. *Agreste Nouvelle-Aquitaine* 7 pp.
- Lucas, V., de Tourdonnet, S., Barbier, J.M., Cittadini, R., Gasselini, P., 2018. Le glyphosate en agriculture de conservation: Un cas illustratif de la dépendance de l'agriculture française aux pesticides. *Journées de Recherche en Sciences Sociales SFER-INRA-CIRAD* 13–14.
- Luna-Acosta, A., Renault, T., Thomas-Guyon, H., Faury, N., Saulnier, D., Budzinski, H., Le Menach, K., Pardon, P., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante, P., 2012. 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 (11), 1335–1340.
- 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 (12), 2663–2670.
- 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.
- 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.
- Moreau, P., Burgeot, T., Renault, T., 2014. Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemocyte are not affected by a mixture of pesticides in short-term *in vitro* assays. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (7), 4940–4949.
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpentina, 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, 67–78.
- Munaron, D., 2004. *Etude des apports en herbicides et en nutriments par la Charente: Modélisation de la dispersion de l'atrazine dans le bassin de Marennes-Oléron* (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie Paris V).
- NF ISO 17244, 2015. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité d'échantillons aqueux sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et de la moule (*Mytilus edulis* ou *Mytilus galloprovincialis*).
- Parker, L.M., Ross, P.M., O'Connor, W.A., 2009. The effect of ocean acidification and temperature on the fertilization and embryonic development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850). *Glob. Chang. Biol.* 15 (9), 2123–2136.
- Pasche, J.S., Piche, L.M., Gudmestad, N.C., 2005. Effect of the F129L mutation in *Alternaria solani* on fungicides affecting mitochondrial respiration. *Plant Dis.* 89 (3), 269–278.
- Pest Management Regulatory Agency, 2004. Regulatory note on Boscalid/BAS 510: Ot-tawa, Canada, Pest management regulatory agency REG2004-02, 118 p., at http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/pubs/pest/_decisions/reg2004-02/index-eng.php.
- Puértolas, L., Damásio, J., Barata, C., Soares, A.M.V.M., Prat, N., 2010. Evaluation of side-effects of glyphosate mediated control of giant reed (*Arundo donax*) on the structure and function of a nearby Mediterranean river ecosystem. *Environ. Res.* 110, 556–564.
- Qian, L., Cui, F., Yang, Y., Liu, Y., Qi, S., Wang, C., 2018. Mechanisms of developmental toxicity in zebrafish embryos (*Danio rerio*) induced by boscalid. *Sci. Total Environ.* 634, 478–487.
- Qualyse & CD17, 2020. Action program, Coastal water quality in shellfish farming areas, 2018–2020 (accessed October 2020).
- Quiniou, F., His, E., Delesmont, R., & Caisey, X. (2005). Bio-indicateur de la toxicité aqueux: " développement embryo-larvaire de bivalve. *Méthodes d'analyse en milieu marin*. Ifremer.

CHAPITRE IV – Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryon-larvaire et pédivélignère chez l'huître creuse (*C. gigas*)

A. Bringer, H. Thomas, G. Prunier et al.

Science of the Total Environment 779 (2021) 146343

- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C., Gerhard, D., 2015. Dose-response analysis using R. *PLoS One* 10 (12), e0146021.
- Saglio, P., Bretaud, S., Rivot, E., Olsén, K.H., 2003. Chemobehavioral changes induced by short-term exposures to prochloraz, nicosulfuron, and carbofuran in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45 (4), 515–524.
- Séguin, A., Mottier, A., Perron, C., Lebel, J.M., Serpentine, A., Costil, K., 2017. Sub-lethal effects of a glyphosate-based commercial formulation and adjuvants on juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) exposed for 35 days. *Mar. Pollut. Bull.* 117 (1–2), 348–358.
- Soletchnik, P., Ropert, M., Mazurié, J., Fleury, P.G., Le Coz, F., 2007. Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. *Aquaculture* 271 (1–4), 384–400.
- Soletchnik, P., Polsenaere, P., Le Moine, O., Guesdon, S., Bêchemin, C., 2015. Relations entre apports terrigènes et conchyliculture dans les Pertuis Charentais. pp. 1–53. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00248/35964/>.
- SOS (Service de l'Observation et des Statistiques), 2010. Les pesticides dans les milieux aquatiques; données 2007. Tregouet B, La Défense 48 pp.
- Spencer, W.F., Clanth, M.M., 1990. Movement of pesticides from soil to the atmosphere. In: Kurtz, D.A. (Ed.), *Long Range Transport of Pesticides*. Lewis Publishers, Chelsea, pp. 1–16.
- Stachowski-Haberkorn, S., Guesdon, S., Bêchemin, C., 2014. TOPHYPAC: Tolérance des communautés phytoplanctoniques aux phytosanitaires dans le panache de la Charente. Programme Évaluation et réduction des risques liés à l'utilisation des Pesticides, Ifremer 57 pp.
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M.E.J., ... Corporeau, C., 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (9), 2430–2435.
- Taltec, K., Huvet, A., Di Poi, C., González-Fernández, C., Lambert, C., Petton, B., ... Paul-Pont, I., 2018. Nanoplastics impaired oyster free-living stages, gametes and embryos. *Environ. Pollut.* 242, 1226–1235.
- Talmage, S.C., Gobler, C.J., 2009. The effects of elevated carbon dioxide concentrations on the metamorphosis, size, and survival of larval hard clams (*Mercenaria mercenaria*), bay scallops (*Argopecten irradians*), and eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Limnol. Oceanogr.* 54 (6), 2072–2080.
- Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J., Moraga, D., 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *FEBS J.* 272 (2), 390–403.
- Tsui, M.T.K., Chu, L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52, 1189–1197.
- Valiente Moro, C., Bricheux, G., Portelli, C., Bohatier, J., 2012. Comparative effects of the herbicides chlortoluron and mesotrione on freshwater microalgae. *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (4), 778–786.
- Vu, H.T., Keough, M.J., Long, S.M., Pettigrove, V.J., 2016. Effects of the boscalid fungicide Filan® on the marine amphipod *Allorchestes compressa* at environmentally relevant concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (5), 1130–1137.
- Weeks-Santos, S., Gonzalez, P., Cormier, B., Mazzella, N., Bonnaud, B., Morin, S., Clérandeau, C., Morin, B., Cachot, J., 2019. A glyphosate-based herbicide induces sub-lethal effects in early life stages and liver cell line of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.* 216, 105291. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105291>.
- Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., Akcha, F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17[alpha]-ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.* 85, 133–142.
- Woodburn, A.T., 2000. Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pesticide Management Science: formerly Pesticide Science* 56 (4), 309–312.

RÉSULTATS MAJEURS

- ⇒ Les pesticides testés ont montré des effets importants sur le développement embryon-larvaire de l'huître creuse (*C. gigas*) avec des malformations et arrêts de développement à 24 h.
- ⇒ Le Roundup, le Nicosulfuron, le Chlortoluron et la Boscalid ont retardé/inhibé la croissance et ralenti la vitesse maximale de nage des larves-D à 24 h de développement.
- ⇒ Grâce aux données environnementales de concentrations, nous avons pu établir plusieurs classements de risque. Lors d'un potentiel pic d'épandage ou ruissèlement important des eaux, durant la période estivale (*i.e.* gamétogénèse chez l'huître), le classement de risque serait le suivant :
Chlortoluron > Roundup = Glyphosate > Nicosulfuron > Boscalid > Isoproturon.
- ⇒ Hypothèse : effets délétères des pesticides, contrairement aux MP, à des concentrations relativement faibles comparables à celles retrouvées dans les eaux marines des Pertuis Charentais.

D. Article 5 : Effets des microplastiques environnementaux aquacoles vieillis, sur la fixation des larves pédivéligères et la croissance des naissains chez l'huître creuse (*C. gigas*)

Cette présente étude s'est intéressée aux effets des plastiques d'origine ostréicoles, vieillis dans l'environnement des Pertuis Charentais, sur le stade pédivéligère chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Après avoir étudié les stades précoces de développement (stade embryon-larvaire et larve-D), il semblait pertinent de s'intéresser au stade de fixation/métamorphose larvaire. Les larves pédivéligères ont été placées en fixation sur de la microbrissure et exposées pendant 7 jours, dans des systèmes aquacoles adaptés, suivant le principe du télécaptage (Glize, 1992). Les différents protocoles et dispositifs expérimentaux mis en place sont explicités dans l'article, ci-dessous. Les larves pédivéligères exposées, se sont fixées sur la microbrissure disposée dans des tamis, placés dans des bacs d'eau de mer sous conditions contrôlées. Trois conditions d'expositions ont été mise en place : 0 (control) ; 0,1 et 10 mg MP .L⁻¹. Les MP environnementaux testés était un cocktail de PP (coupelle de captage), HDPE (poche ostréicole) et PVC (tube de captage), d'une taille moyenne de 138 µm. Ces MP sont issus des macroplastiques ostréicoles collectés sur le littoral pilote des Pertuis Charentais (cf. Chapitre III, Article 1). Par la suite, les naissains se sont développés en micronurserie puis en nurserie. Lorsque les huîtres ont atteint une taille adéquate, elles ont été placées dans des casiers de mailles fines, en claires ostréicoles, au Marais expérimental CNRS (L'Houmeau, Charente-Maritime). La quantification des larves fixées, a été effectuée, pour chaque condition d'exposition. Le suivi de la croissance au stade pédivéligère et naissain a été entrepris sur 11 mois de développement. Le taux de fixation était significativement plus faible pour les larves exposées, à la plus forte concentration de MP testée (10 mg MP.L⁻¹). La croissance des larves et des petits naissains était plus faible au cours des premiers jours de développement, pour les conditions exposées aux MP. Ensuite, les retards de croissance ont été rattrapés, puis la croissance a été plus importante sur la fin du suivi, pour les huîtres creuses exposées en amont, en comparaison avec la condition control. Cette étude fournit de nouvelles données sur les différents stades de vie des huîtres, permettant une meilleure compréhension des effets potentiels des MP environnementaux sur les bivalves au cours de leur développement en milieu naturel. De plus, peu d'études se sont polarisées sur des suivis à long terme, à la suite d'expositions aux MP, en mimant les conditions réelles susceptibles d'être constatée à proximité des concessions ostréicoles.

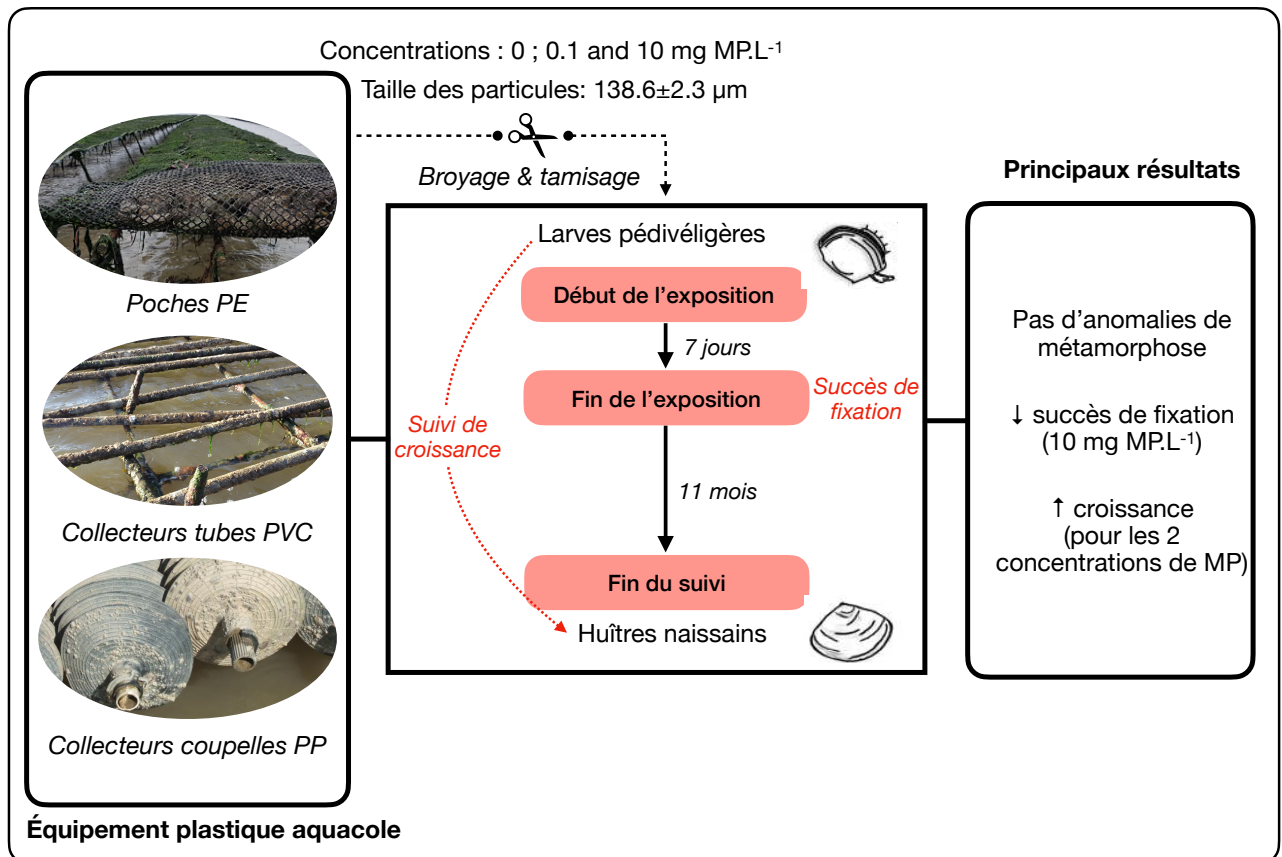


Figure 39. Schéma résumant les travaux réalisés dans le cadre de l'Article 5.



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Short Communication

Evidence of deleterious effects of microplastics from aquaculture materials on pediveliger larva settlement and oyster spat growth of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*



Arno Bringer^{a,*}, Jérôme Cachot^b, Emmanuel Dubillot^a, Bénédicte Lalot^a, Hélène Thomas^a

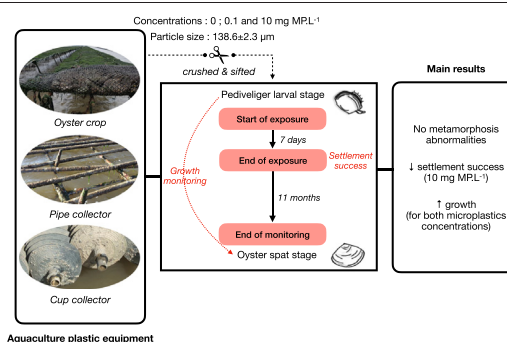
^a Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

^b Université Bordeaux, CNRS, EPOC, EPHE, UMR 5805, F-33600 Pessac, France

HIGHLIGHTS

- Aged aquaculture microplastics cocktail were tested during pediveliger and spat stages.
- Microplastics induced lower settlement success for exposed oyster pediveliger larvae.
- Growth delays were noted at 28 days of development for the exposed oysters.
- Oysters previously exposed to microplastics, had a greater growth after 11 months.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 April 2021

Received in revised form 3 June 2021

Accepted 23 June 2021

Available online 25 June 2021

Editor: Dimitra A Lambropoulou

Keywords:

Aged microplastics

Oyster

Pediveliger larvae

Spat

Growth

Settlement success

ABSTRACT

Plastic is currently used in aquaculture as a material for settlement and magnification of oyster spats. Plastic weathering and fragmentation under natural conditions can lead to the production of micro and nanoparticles and additive leakage, with potential toxic effects on marine life. This study investigates the effects of the exposure to microplastic (MPs) cocktail derived from aged aquaculture material on oyster pediveliger larvae (*Crassostrea gigas*). The cocktail was made of high-density polyethylene (HDPE), polypropylene (PP) and polyvinyl chloride (PVC). The concentrations tested were 0, 0.1, and 10 mg MP·L⁻¹. During the 7-day fixation phase, pediveliger larvae (17 days) were exposed to the MP cocktail in laboratory-controlled conditions. After exposure, the success of settlement was significantly lower for larvae exposed to 10 mg MP·L⁻¹ (49 ± 0.9%) compared to control ones (61.8 ± 1.6%). No malformations or metamorphosis abnormalities were observed. Growth of pediveliger and spat stages was monitored up to 11 months. During the first twenty-eight days of development, spat growth was significantly lower for the two MPs exposure conditions (0.1 and 10 mg MP·L⁻¹; respectively -51.8% and -44.4%) compared to control group. Subsequently, the previously exposed oysters grew faster than the control condition, resulting in a significantly greater growth (0.1 and 10 mg MP·L⁻¹: +18.3% and +19.7%) than the control group at the end of follow-up. The nearly one-year follow-up highlighted the potential effects of MPs from aquaculture on larvae and spat of *C. gigas*.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In 2019, plastic production reached 370 million tons worldwide, including almost 58 million tons in Europe (PlasticsEurope, 2020). Seen as revolutionary and versatile, plastic materials are part of one's daily life.

* Corresponding author.

E-mail address: arno.bringer1@univ-lr.fr (A. Bringer).

Ideal for the current economic system, they incur low production costs, and are light, durable and malleable. The first studies revealing MP presence in marine habitats date back to the 1970s (Carpenter et al., 1972). It is estimated that rivers carry between 70% and 80% of plastic waste, most of which ends up in oceans (Horton et al., 2017). Each year, over 9.5 million tons of plastics are dumped into oceans (Boucher et al., 2020). In 2019 (PlasticsEurope, 2020), the plastics demand focused on Polypropylene (PP, 19.4%), Low Density Polyethylene (LDPE, 17.4%), High Density Polyethylene (HDPE, 12.4%), and Polyvinyl-Chloride (PVC, 10%). Plastic gear is necessary for the viability of many aquaculture and shellfish farming operations (Schoof and DeNike, 2017). More recently, questions have arisen regarding the potential contributions of aquaculture to marine debris and the formation of MPs particles. Most varieties of oyster culture around the world rely on equipment and gear to develop a specific product, respond to environmental conditions, or provide protection for bivalves (Pacific Coast Shellfish Growers Association, 2011; USACE, 2015). Plastic is primarily used in gear such as nets, crops, or attachment tubes/cups, designed to contain or protect farmed molluscs from predators or environmental conditions (Pacific Coast Shellfish Growers Association, 2011; USACE, 2015). In the seas, macroplastics first undergo physical degradation, by waves, salt, hydrolysis, temperature, and photodegradation from the sun's ultraviolet rays (Julienne et al., 2019; Andrady, 2017; Alimi et al., 2018; Chubarenko et al., 2020; Hernandez et al., 2019), before facing biological degradation, by bacterial processes (Dussud and Ghiglione, 2014), creating MPs (fragments <5 mm, Thevenon et al., 2014). Plastics have invaded all marine habitats around the world (Kershaw and Rochman, 2015; Li et al., 2016). Scientists have estimated that oceans concentrated more than 5 trillion pieces of plastic materials, gathering 1 to 102,000 particles/m³ (Van Cauwenberghe et al., 2015; Auta et al., 2017). Plastic pollution affects marine ecosystems and human activities. When ingested by organisms, they cause abrasions, obstructions, and alterations in physiological structures, directly influencing the survival of individuals (Wright et al., 2013). Recent studies have shown that commercial MPs can affect the early stages of bivalve development (Tallec et al., 2018; Bringer et al., 2020a). These studies have shown the effects of polystyrene (PS)-nanoplastics (NPs) (50 nm, 10 µg·mL⁻¹) and HDPE-MPs (4–13 µm, 0.1 mg·L⁻¹) on development (malformations and survival) and on swimming behaviour in oyster larvae, *C. gigas*. The early stages of development are the stages most sensitive to environmental hazards and to potential environmental pollution and contamination (Gamain et al., 2020). Cole and Galloway (2015) demonstrated the ingestion of 70 nm to 20 µm PS-MPs/NPs particles in *C. gigas* larvae over the days 3 to 24 after fertilization. However, the study by Sussarellu et al. (2016) showed transgenerational effects of PS-MPs on larval growth following exposure of parents for two months. Nonetheless, information on environmentally-aged MPs is limited. Gardon et al. (2020a, 2020b) investigated the effects of both new and aged MPs on the early stages of pearl oyster development (*Pinctada margaritifera*). They concluded that a 48-h exposure to MPs significantly increased the larval mortality rate. In addition, MPs with a high surface/volume ratio tended to adsorb persistent organic pollutants while in marine environments (e.g. dichlorodiphenyltrichloroethane [DDT], polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals; Beaumont et al., 2019; Rochman et al., 2013; Bakir et al., 2014). During fragmentation or ageing in an aquatic environment, plastics can release additives, such as phthalates (Koumba, 2018), UV stabilizers, antioxidants (Rani et al., 2017), biocides (Beiras et al., 2021) or dyes. Thus, it is essential to assess toxicity of environmentally-aged MPs on marine fauna. In 1970, due to the economic development of modern societies, questions were raised internationally in relation to plastic waste (Rocher, 2008; Dupré, 2013). Few studies considered plastic materials from aquaculture and fishing activities. Nevertheless, materials and tools from aquaculture professionals are likely to interfere with bivalve organisms (production and capture phases). Fishing gear – abandoned, lost, or discarded – is the main source of plastic waste from the fishing and aquaculture sectors, although their implication in ocean

pollution is overlooked by the public (Lusher et al., 2017). The aquaculture and shellfish-farming sector has diversified and expanded massively with the importance of exports in France. Following extreme hydroclimatic events (e.g. storms, strong winds or currents, etc.), professional materials break off and drift to beaches and coasts during high tides. The French shellfish market is of importance. Each year, nearly 130,000 tons of oysters (*C. gigas*) are produced and marketed, while the activity generates more than 20,000 jobs (CNC, 2020). The sustainability of shellfish companies is water-quality dependent. Due to their filtration feeding activities, bivalves such as oysters absorb and accumulate MPs in marine environments (Li et al., 2018; Phuong et al., 2018; Teng et al., 2019). In addition, oysters are key ecological and economic species in coastal ecosystems. They are also used as a model species in laboratory experiments for the assessment of MPs toxic effects (Teng et al., 2021). Except for the work of Tallec et al. (2018) on commercial PS-NPs, no study has determined the toxicity of MPs or NPs on pediveliger larvae of oyster. For the experiment, pediveliger larvae were exposed for seven days to MPs from aquaculture (cocktail of HDPE crops, PP collection cups and PVC collection tubes) at two theoretical concentrations (i.e. 0.1 and 10 mg MP·L⁻¹). Study (i) determined larval settlement success after 7 days' exposure to different treatments, and (ii) monitored growth for nearly a year (11 months), until larvae reached the spat stage.

2. Materials and methods

2.1. Pediveliger larvae

Crassostrea gigas (Bayne et al., 2019; Bayne et al., 2017) 17-day-old pediveliger larvae were supplied by a commercial hatchery (France Naissain, France). Upon reception and before starting experiments, the mobility and good health status of larvae were assessed (Motic 1820, ×20 objective).

2.2. Seawater and preparation of microplastics from aquaculture

Plastic macrodebris were collected on the French Atlantic coast (South West, France), in Angoulins-sur-mer municipality beach area (Bringer et al., 2021). They were sorted and classified, selecting only plastics aged in the marine environment, and from the oyster industry. Polypropylene cup collectors (PP), pipe collector (PVC) and high-density polyethylene oyster culture crops (HDPE) were chosen. A GC-MS pyrolysis analysis (700 °C) characterised the polymers of the selected materials (manual cutting to obtain samples of 130–200 µg). After a rough cut (3–4 cm), the plastics were crushed using a stationary metal hammer, and this was repeated several times. Then, the plastics were sieved using 5 mm, 1 mm and 100 µm sieves. The grinding was carried out at room temperature so as not to influence the nature of the material. The cocktail consisted of 28% HDPE, 40% PP, and 32% PVC (Andrady, 2011). The size range of the cocktail of MPs was 138.6 ± 2.3 µm (three analytical replicates in laser particle size distribution, Malvern). Seawater was sampled in the Atlantic (South West, France), before being filtered with 50 µm and 10 µm membranes to eliminate debris and microorganisms (i.e. filtered seawater, FSW).

2.3. Analysis of exposure solutions

To carry out a quantitative analysis of MPs in experimental seawater, each theoretical cocktail solution (0, 0.1, and 10 mg MP·L⁻¹) was analysed using a flow cytometer (Attune Acoustic Focusing Cytometer). Two-milliliter samples from each MP exposition solution ($n = 4/\text{condition}$) were vortexed (StarLab Vortex IR, 12,000 rpm for 20 s) to homogenize the solutions and then 300 µL was taken for flow cytometry analysis. A calibration was carried out, thanks to previous studies (Bringer et al., 2020a) with commercial MPs, to achieve an analysis rate of 500 µL·min⁻¹ and a saturation of 10,000 particles maximum detected. From the control conditions (10 µm FSW), control analytical

CHAPITRE IV – Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryo-larvaire et pédiveligère chez l'huître creuse (*C. gigas*)

A. Bringer, J. Cachot, E. Dubillot et al.

Science of the Total Environment 794 (2021) 148708

samples ($n = 12$) were created. The blank obtained enabled removal of background particles (naturally present in seawater). Using seawater filtered at $0.2 \mu\text{m}$, a first calibration was conducted to select the <200 -time detected particles. MPs measurements in seawater were assessed at D_0 (beginning of exposure) and D_7 (end of exposure) for all exposure conditions.

2.4. Experimental design

2.4.1. Exposure of pediveliger larvae in experimental microcosms

Pediveliger larvae (D_0) were acclimatised for a few hours in petri dishes at microcosm temperature ($24 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$) for fixation (Fig. S1). Microcosms have been defined as experimental systems simulating real-life conditions (Buffet et al., 2014; Martínez-Sosa and Tierney, 2019; Enya et al., 2020). Fifteen thousand (15,000) larvae/condition with three replicates were added to experimental sieves, i.e. 45,000 larvae/condition. Then, larvae were exposed in the dark for 7 days (step 1: settlement phase, from D_0 to D_7 , Fig. 1). The exposure conditions were as follows: larvae were put in $195 \mu\text{m}$ sieves (three replicates per condition), at the surface of a $300\text{--}400 \mu\text{m}$ microbreak layer (Ovive industry, La Rochelle, France), and placed in 224 L tanks. Microbreaks correspond to very finely crushed oyster shells. Microbreaks were cleaned before use in microcosms. The sieves ($n = 3$ /conditions) were then placed on a table inside a tank where the FSW circulated. Sieves were all connected by an air-lift system creating a bottom-up movement of FSW ($2.3 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ /sieve), allowing a continuous renewal of water in the sieves containing the pediveliger larvae. The temperature was $24.0 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$, and salinity 28.2 ± 0.3 (Table 1). Continuous

bubbling and brewing systems were set up. Brewers were installed in the microcosms in order to homogenize the dispersion of the MPs. The temperature value and salinity were measured daily. Throughout the experiment, nitrates, nitrites, chlorine, and pH (7.1 ± 0.4) were regularly measured to ensure consistency. This experimental device was based on Glize's (1992) work. The day before the start of the exposure, the cocktail of MPs was inserted into the tanks (224 L) according to three theoretical concentrations tested: 0 (control without MP); 0.1 and $10 \text{ mg MP}\cdot\text{L}^{-1}$. To do this, precise quantities of MPs cocktail were weighed ($n = 7$, i.e. 7 days of exposure with one renewal every day), before being inserted into the microcosms, for the two conditions of exposure to MPs: 22.4 mg for $0.1 \text{ mg MP}\cdot\text{L}^{-1}$ and 2240 mg for $10 \text{ mg MP}\cdot\text{L}^{-1}$. The water was changed every day and the sieves were transferred to tanks prepared in advance, and the cocktail of MPs was added at each renewal according to the conditions. The pediveliger larvae were fed twice a day with algae paste (mixed diet of *T. Isochrysis galbana*, *Pavlova*, *Tetraselmis*, *Thalassiosira* and *Nanno*, Shelfish diet). At this stage of their development, the larvae are more sensitive to environmental risks (Connor, 1972; Martin et al., 1981; Quiniou et al., 2005), hence the importance of respecting the protocols of renewal of water and daily food to avoid significant mortalities.

2.4.2. Experimental hatchery for long-term development

After a 7-day exposure period, pediveliger larvae were put in experimental hatchery devices (step 2, Fig. 1). After D_7 , fixed larvae were placed in a micronursery. In an open circuit, FSW ($10 \mu\text{m}$) circulated at a flow rate of $27 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ (132% renewal every day). The temperature was $21.3 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$, and salinity 25.1 ± 0.3 (Table 1).

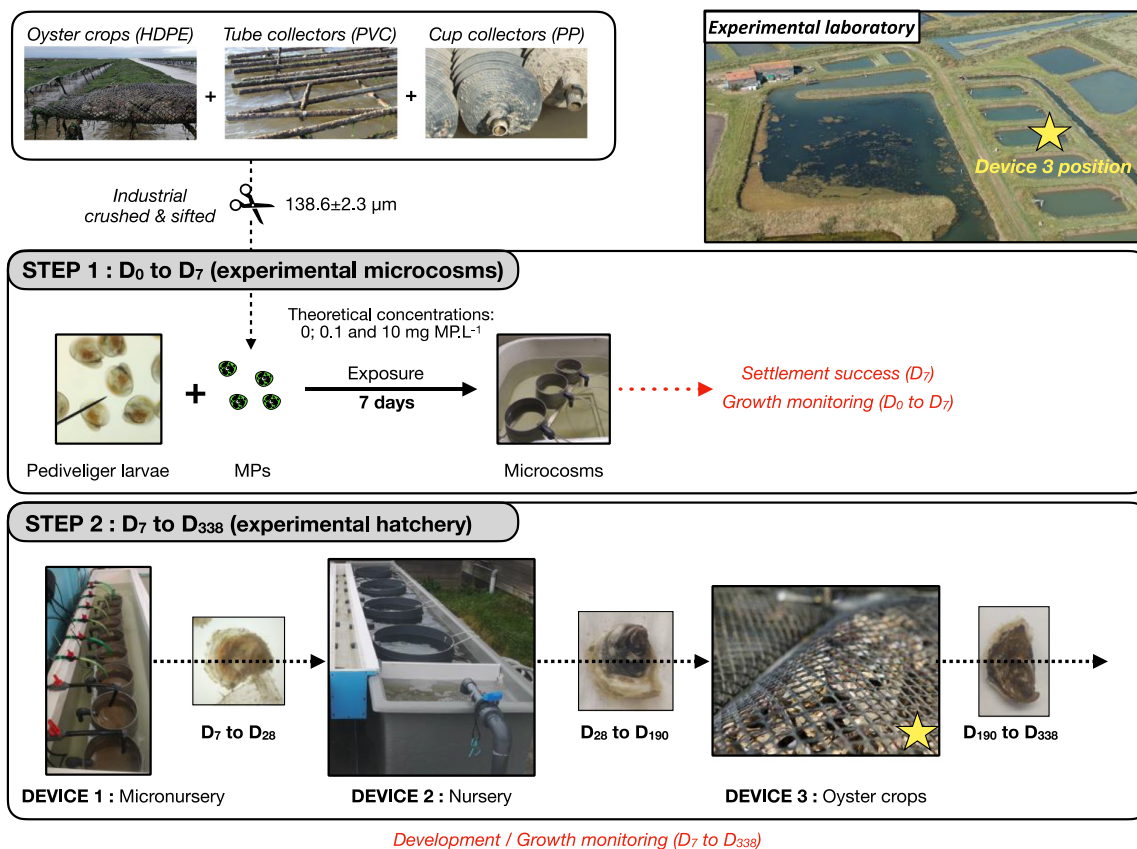


Fig. 1. Experimental devices to develop pediveliger larvae into oyster spat *C. gigas*. Step 1: 7-day exposure (D_0 to D_7 , settlement success) in experimental microcosms. Step 2: development (D_7 to D_{338}) in experimental hatchery. Length growth was monitored for the entire experiment (from D_0 to D_{338} , i.e. 11 months).

CHAPITRE IV – Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryon-larvaire et pédivéliger chez l'huître creuse (*C. gigas*)

A. Bringer, J. Cachot, E. Dubillot et al.

Science of the Total Environment 794 (2021) 148708

Table 1

Essential parameters (temperature, salinity, and light) for development of pediveliger larvae and oyster spat in various aquaculture devices.

Water parameters	Microcosms	Micronursery	Nursery	Oyster farm
Temperature (°C)	24 ± 0.1	21.3 ± 0.5	19.4 ± 0.6	15.9 ± 2.5
Salinity	28.2 ± 0.3	25.1 ± 0.3	32.0 ± 0.7	32.6 ± 1.5
Light	Dark	Natural	Natural	Natural

At D₂₈, oyster spat were transferred to an outdoor nursery (seawater filtered at 30 µm). The flow rate was 2117.6 L·h⁻¹ (7260% renewal every day), temperature 16.3 ± 1.0 °C, and salinity 27.4 ± 0.7 (Table 1). Once in the nursery, spat were exclusively fed with naturally-present phytoplankton. Larger mesh sieves were used (500, 1000 and 3000 µm) to allow larval magnification. Then, oyster spat were placed in 4000 µm mesh crops and placed in experimental beds (D₁₉₀, CNRS platform, La Rochelle, France). Fig. 1 summarises the development cycle from pediveliger larvae to oyster spat. It includes the aquaculture devices used for oyster development, and indicates the beginning of the exposure period (D₀), the settlement success (end of exposure; D₇), and the growth monitoring analysis (D₀ to D₃₃₈).

2.5. Settlement success and growth monitoring of pediveliger larvae

After a 7-day exposure period to MPs cocktail, at different concentrations, an analysis of the larval settlement ratio was performed, quantifying larvae that were fixed in each condition and replicate ($n = 3$ /condition). A ratio was calculated from the weight of samples taken ($n = 3$ /replicates, *i.e.* $n = 9$ /conditions) and the total weight corresponding to the total quantity of pediveliger larvae at the start of the experiment. After being weighed, the samples taken were analysed under a microscope (Motic 1820, 200×) and the number of larvae fixed was quantified. The oyster growth in length was monitored at pediveliger and early spat stages, taking microphotographies under the Motic 1820 Binocular microscope (200×). Length of larvae was measured on photographs with Image J. Pediveliger larvae were oriented lengthwise under the microscope (Motic 1820, ×20 objective) and a line was drawn with Image J (Talmage and Gobler, 2009; Helm et al., 2004; Bringer et al., 2020b). To carry out the growth analysis, pediveliger larvae ($n = 30$) in each replicate and condition ($n = 90$ /conditions) were measured. Results are expressed in mean ± SEM. Then, oyster spat ($n = 30$ /replicate, *i.e.* $n = 90$ /condition) were measured (length, width, and thickness) and weighed (total weight) using a digital caliper (0.1 mm) and precision balance (0.1 g, Denver Instrument). Results are expressed in mean ± SEM. During the exposure period (D₀ to D₇, microcosms, Fig. 1), growth was quantified every two days. During the experimental hatchery period (D₇ to D₁₉₀, device 1 and 2, Fig. 1), growth was quantified every 4 days. Finally, during the period in oyster beds, growth was quantified once a month (D₁₉₀ to D₃₃₈, device 3, Fig. 1).

2.6. Statistics

A statistical analysis was conducted using R Studio and graphs on Microsoft Excel. Homogeneity of variance (Levene's test) and normality of distribution (Shapiro-Wilk) were assessed. To compare the settlement success in each treatment, an analysis of variance (ANOVA) was performed followed by a Tukey's post-hoc test. A statistical analysis of growth biomonitoring data was carried out through the Kruskal-Wallis test. Then, differences in mean concentrations were assessed using the Kruskal Nemenyi Post-hoc test, coupled with the PMCMR package (equivalent to the Tukey's test for non-parametric data). A significance was accepted for $p < 0.05$. Data are expressed in mean ± SEM.

Table 2

Theoretical and measured MP concentrations (mean ± SEM) at the beginning (D₀) and at the end of the pediveliger exposure (D₇).

Sampling times	Theoretical (mg MP·L ⁻¹)	Measured (MP·µL ⁻¹)	Concentration factor
D ₀	0.1	0.88 ± 0.07	-
D ₇	0.1	0.97 ± 0.09	-
D ₀	10	7.8 ± 0.65	8.88 ± 0.12
D ₇	10	8.9 ± 0.27	9.17 ± 0.54

3. Results and discussion

3.1. MP exposure concentrations

The concentrations of MPs for the two exposure conditions (Table 2) varied between D₀ (start of exposure) and D₇ (end of exposure). The results of this present study are comparable to the concentrations assayed by flow cytometry in a previous study on commercial HDPE-MPs of 20–25 µm (Bringer et al., 2020a). In accordance with theoretical factors, the dilution factor of the two concentrations tested should equate to 100. However, factors at D₀ and D₇ were of 8.88 ± 0.62 and 9.17 ± 0.37. The theoretical 10 mg MP·L⁻¹ condition suggested that the real dilution factor was lower in display tanks. The differences observed between the theoretical and measured concentrations of MPs could come from aggregation of MPs together (Alimi et al., 2018; Michels et al., 2018) and binding on the walls of exposure microcosms. Despite the use of brewers, MPs might be heterogeneously dispersed in the exposure medium. By taking into account the assays carried out at D₀ and D₇, we can calculate the mean concentrations corresponding to the theoretical concentrations: 0.9 ± 0.08 (0.1 mg MP·L⁻¹) and 8.4 ± 0.5 (10 mg MP·L⁻¹). No microparticles were found in the waters of the control condition.

Through flow cytometry, MP concentrations in exposure conditions were determined. Long et al. (2017) assessed PS-MPs concentrations using flow cytometry. Recent studies have measured the concentrations of nano and microparticles through flow cytometry (Caputo et al., 2021; Kaile et al., 2020). In this work, concentrations were higher than measured in the marine environment (Van Cauwenberghe et al., 2015; Auta et al., 2017). A previous study measured 13.4 ± 0.9 MP·L⁻¹ in the coastal Atlantic sector (Green et al., 2018). In addition, the study published by Frere et al. (2017), showed concentrations of 0.24 ± 0.35 MP·m⁻³ in the Bay of Brest (France). These different results prove to us that our experimental concentrations are stronger than the natural environment. However, the use of aged aquaculture MPs in the marine environment has increased knowledge on the toxicity of plastic particles at early stages of development in *Crassostrea gigas*. Apart from this research, few studies focused on aquaculture plastics and their impacts.

3.2. MP effects on the settlement success of pediveliger larvae

After a 7-day exposure, pediveliger larvae were removed from the microcosm devices and were put in the micronursery (device 1 of experimental hatchery, Fig. 1). Fixed larvae were counted using a microscope. In the control condition (without MPs), 9266 ± 246 ($n = 3$ replicates) out of the 15,000 larvae at D₀ were fixed. In the 0.1 and 10 mg MP·L⁻¹ conditions, 9188 ± 129 and 7352 ± 142 larvae were fixed (Fig. 2).

In the control condition, 61.8 ± 1.6% larvae were successfully fixed. In the 0.1 mg MP·L⁻¹ condition, the ratio indicated 61.3 ± 0.9%, which did not statistically differ from the control condition ($p = 0.95$). However, in the 10 mg MP·L⁻¹ condition, the ratio was 49.0 ± 0.9%, differing significantly from the other two conditions ($p < 0.001$). The average rate of *C. gigas* larval settlement in remote microbreaks currently reaches 65% (Bodoy, 1990). In this work, the control condition displayed

CHAPITRE IV – Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryo-larvaire et pédiveligère chez l'huître creuse (*C. gigas*)

A. Bringer, J. Cachot, E. Dubillot et al.

Science of the Total Environment 794 (2021) 148708

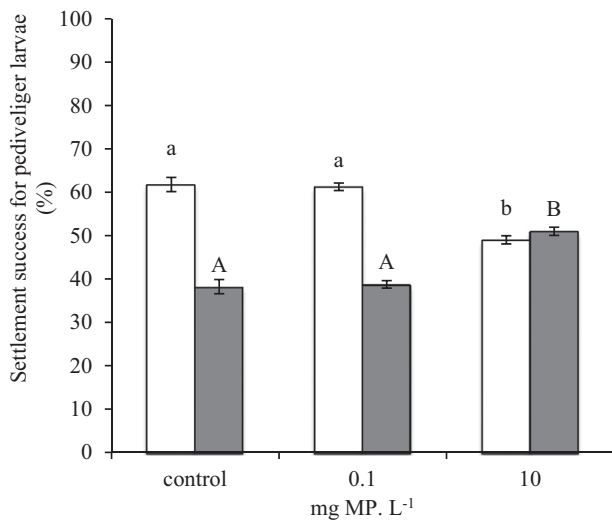


Fig. 2. Settlement success of pediveliger larvae of *C. gigas* after a 7-day exposure: control (0 mg MP·L⁻¹), 0.1 and 10 mg MP·L⁻¹. Values are expressed as mean ± SEM (n = 3 replicates/conditions, i.e. n = 9/conditions). Different letters at the top of the bars indicate significant differences between concentrations (p < 0.05, Anova and Tukey test).

a binding rate of approximately 62%. The experimental system was thus considered valid. After a few days of development in the micronursery, fixed pediveliger larvae began to grow shells (Fig. 3). In all conditions, no delay in shell development nor developmental abnormalities (malformations) were noted.

In an earlier study, pediveliger larvae (*C. gigas*) were exposed for a period of 24 h, showing decreased metamorphosis rates with increasing drug concentrations tested, greater than what is found in the natural environment (Di Poi et al., 2014). In the study conducted by Vignier et al. (2016), exposure of oyster pediveliger larvae (*C. virginica*) for 72 h to increasing doses of CEWAF (dispersed oil) induced settlement inhibition

in a dose-dependent manner. The authors concluded that the settlement success was sensitive to environmental parameter variations and pollutant exposure (Vignier et al., 2016). Wang et al. demonstrated that the pediveliger larvae of *Pinctada maxima* are more prone to attach to natural collectors (palm rope collector) than to plastic collectors (Wang et al., 2017). Larvae were considered metamorphosed if they displayed clear loss of velum and foot, shell growth and well-developed gills. Mottier et al. (2014) exposed pediveliger larvae for 24 h to glyphosate in commercial formulations and observed a reduction of the larval metamorphosis rate. Tallec et al. (2018) did not observe impacts on the metamorphosis of exposed *C. gigas* following 24 h of exposure. A variation in particle size (MPs or NPs) or concentration had no influence. In addition, after PS-MPs/NPs treatments, there were no developmental abnormalities in oysters (Tallec et al., 2018). These results echoed our own observations, showing no impacts on larval metamorphosis and no developmental abnormalities during fixation. MPs had no impacts on the development of pediveliger larvae, most likely due to their protective shell (Hickman, 1999; Liebig and Vanderploeg, 1995; Schiaparelli et al., 2004). Nonetheless, no studies reported MP impacts on fixation, i.e., with lower fixation rate in larvae exposed to high concentrations. MPs could affect the energy dynamics of pediveliger larvae (Sussarellu et al., 2016; Rico-Villa et al., 2010). Larvae would lose their fixation capacities as they lack energy reserves, constantly fighting against MPs in their environment. Effects were noted on the energy reserves of sediment-dwelling bivalves. Indeed, the lipid content was lower in bivalves exposed to MPs (Auclair et al., 2020; Bour et al., 2018). The drifting and structure of marine organisms could be influenced by chronic MP exposure (Sendra et al., 2021). In addition, recent studies have highlighted that MPs may affect immune enzyme activities and immune-related gene expression (Gardon et al., 2020a, 2020b; Huang et al., 2020). Authors hypothesised that the defence mechanisms at larval stages could be weakened and therefore individuals could be more sensitive to environmental factors such as pathogens or potential MPs (Thomas-Guyon et al., 2009). Larvae of the Pacific oyster *C. gigas* appeared to acquire their own defence mechanisms during development. Potentially weakened by MPs, pediveliger larvae would have recourse to an adapted defence system to fight

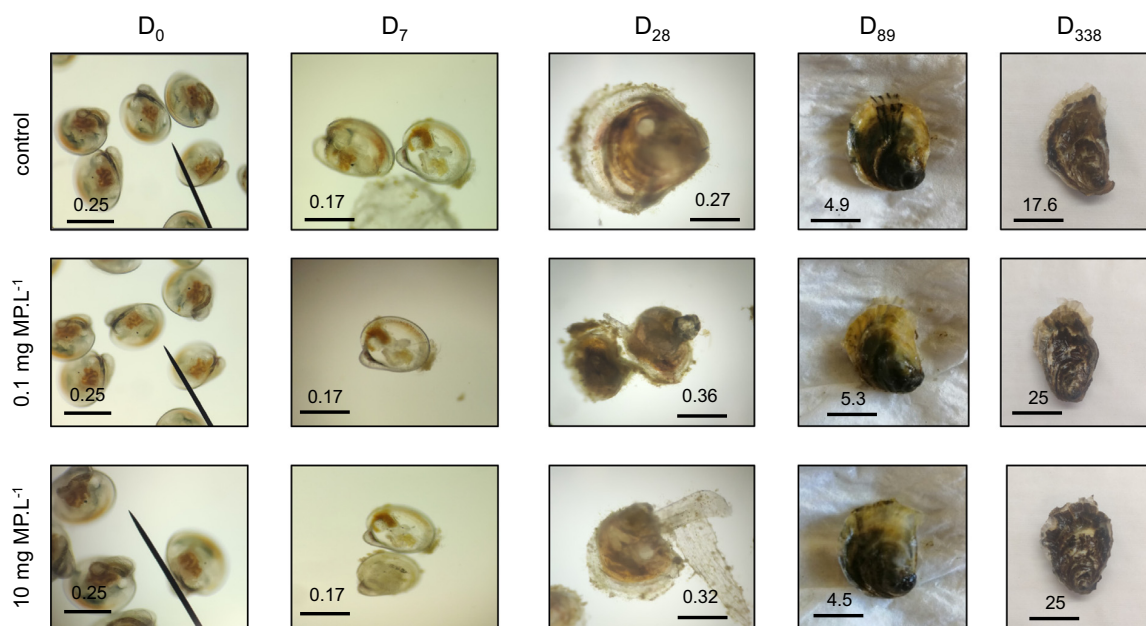


Fig. 3. Microphotographs and pictures of pediveliger larvae from the beginning (D₀) to the end of the experiment (D₃₃₈) – including MP exposure (D₇ – step 1), spat development (D₂₈ and D₈₉ – step 2), and monitoring (D₃₃₈). Photos were taken in each condition: control (0 mg MP·L⁻¹); 0.1 and 10 mg MP·L⁻¹. Scales are expressed in mm. Observations and photographs were performed at 5× or 20× using a binocular microscope (Motic). “D_x” indicates the sampling times in days.

against plastic contamination, which can generate significant energy consumption, detrimental to growth for example.

3.3. MP effects on pediveliger larvae development and oyster spat growth

Length growth (in mm, Fig. 4.a) was monitored at pediveliger larval stage from the beginning to the end of exposure (D_0 to D_7 , Fig. 3) and then until the spat stage, 11 months later (D_{338} , Fig. 3). A 7-day exposure to MPs led to growth retardation of larvae up to 28 days (D_0 to D_{28} , Fig. 4.c). Indeed, there was a significant difference of growth rate between the control condition (0.54 ± 0.05 mm of growth for 28 days) and the 0.1 and 10 mg $MP \cdot L^{-1}$ conditions (0.26 ± 0.02 and 0.30 ± 0.02 mm of growth for 28 days). Oysters had similar growth rate between D_{28} and D_{89} (Fig. 4.d), with no significant variation between the conditions tested. The larvae from the control had a growth of 9.5 ± 0.9 mm, while the larvae from the 0.1 and 10 mg $MP \cdot L^{-1}$ conditions grew at 8.1 ± 0.7 and 8.6 ± 0.7 mm for 61 days (from 28 to 89 days). From D_{89} to D_{338} (end of growth monitoring), pre-exposed oysters exhibited high growth during their development (Fig. 4.e). Control spat grew 32.1 ± 2.0 mm while the spat from the 0.1 and 10 mg $MP \cdot L^{-1}$ conditions had similar growth of 41.5 ± 2.5 mm and 41.3 ± 2.1 mm, for 249 days (from 89 to 338 days, Fig. 4.e).

The total growth (D_0 to D_{338}) was significantly higher in MPs-exposed oysters in comparison to control individuals (Fig. 4.b). Indeed, the control condition observed a total growth of 42.1 ± 1.9 mm while the 0.1 and 10 mg $MP \cdot L^{-1}$ conditions displayed a total growth of 49.8 ± 2.0 and 50.4 ± 2.1 mm (Fig. 4.b). Our results indicate that the oyster growth during the fixation phase was delayed by MPs exposure. Then, the growth at

the end of experiment turned out to be higher than for oysters from the control condition. Few studies monitored the growth of exposed invertebrates on a long-term basis. In some cases, growth, respiration and filtration rates of oysters were not impacted by MPs, compared to other benthic study models that were weakened by exposures to MPs (Green, 2016). Revel et al. (2020) showed that PE and PP-MPs ($<400 \mu m$) had no significant toxicity on adult oysters after 10 days of exposure to $0-100 \mu g MP \cdot L^{-1}$. Cole and Galloway (2015) reported that PS-MPs of 1 and $10 \mu m$ restricted algal feeding of oyster larvae, but there were no consequences on the growth of oyster larvae exposed up to $100 MP \cdot mL^{-1}$. After a two-month exposure to low and high doses of PLA (polyactic acid) or HDPE-MPs, filtration and growth rates of adult *Ostrea edulis* were unaltered (Green, 2016). Because of the relatively low toxicity and long-term effects of MPs and additives, toxic effects analysis over a long period of time is particularly relevant. Analysis of metabolic rates and assimilation efficiency indicated a decrease in mean energy balance, when comparing adults from the control condition to those exposed for two months to 0.25 and $2.5 \mu g \cdot L^{-1}$ micro-PS (Gardon et al., 2018). The impacts on growth and energy dynamics are likely interconnected. Widdows and Johnson (1988) suggested that the energy available for growth should be a balance between the energy from food consumption and that used for respiration. Oyster larvae facing chronic MPs exposure could consume the energy dedicated to the fixation and development. Sussarellu et al. (2016) exposed adult oysters during gametogenesis for two-months to $23 \mu g \cdot L^{-1}$ PS-microbeads ($2-6 \mu m$) and reported delayed larval growth. Watts et al. (2015) fed crabs (*Carcinus maenas*) over a period of 4 weeks (fed 2-3 times per week) with different amounts of PP rope microfibers (0; 0.3; 0.6 and 1% added to food). Those fed with

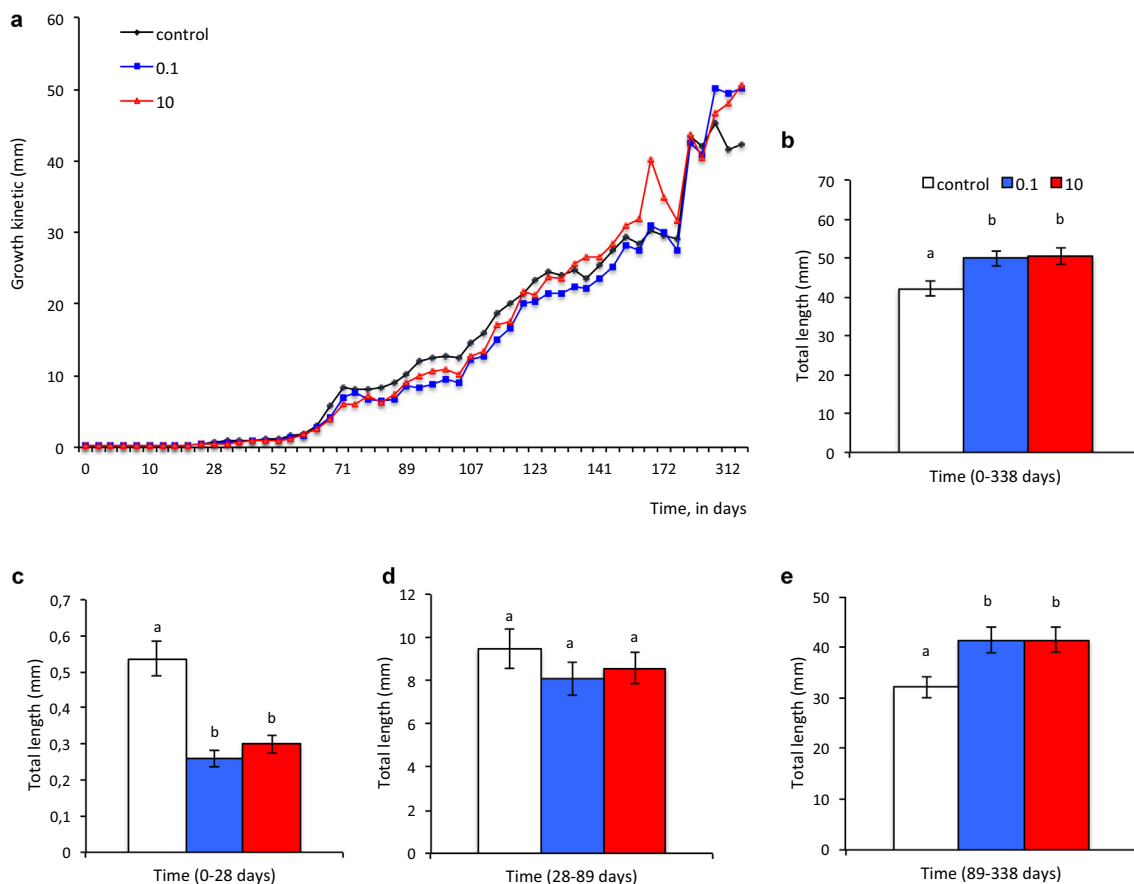


Fig. 4. (a) Growth kinetic (D_0 to D_{338}) (b) and total length of *C. gigas* pediveliger larvae and oyster spat. (c) Graphical displays on total length from D_0 to D_{28} ; (d) D_{28} to D_{89} and (e) D_{89} to D_{338} in various exposure conditions: control ($0 \text{ mg } MP \cdot L^{-1}$), 0.1 and 10 mg $MP \cdot L^{-1}$. Values are expressed in mean \pm SEM ($n = 30$ /replicates, i.e. $n = 90$ /conditions). Different letters at the top of the bars indicate significant differences between exposure conditions ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis and Nemenyi test).

CHAPITRE IV – Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryo-larvaire et pédivéliger chez l'huître creuse (*C. gigas*)

A. Bringer, J. Cachot, E. Dubillot et al.

Science of the Total Environment 794 (2021) 148708

plastics had a significant decrease in growth, mainly driven by a reduced food consumption over time. Larvae (*Crepidula onyx*) fed with higher concentrations (30 and 70% of the algal concentration with final concentration of 6×10^4 and 1.4×10^5 particles·mL⁻¹ respectively) of micro-PS (2–5 µm) than those found in the environment were smaller due to their reduced growth rate, in comparison to the control species (Lo and Chan, 2018).

4. Conclusions

This study observed the effects of a cocktail of MPs (138.6 ± 2.3 µm) containing particles of HDPE, PP and PVC from aquaculture plastics aged in the marine environment. After an exposure period of 7 days, the settlement success of the pediveliger larvae was evaluated. Then, an 11-month follow-up was carried out to monitor the growth in length of the pediveliger larvae up to the spat stage. Larvae exposed to 10 mg MP·L⁻¹ showed a lower binding rate to substrate. In addition, the larvae exposed to the two concentrations of MPs (0.1 and 10 mg MP·L⁻¹) exhibited growth retardation over 28 days of follow-up. At the end of the experiment (at 338 days), the spat produced from the larvae exposed to the MPs recovered their growth retardation, and over 11 months had a total growth greater than the control group. The energy used by larvae facing MPs exposure could affect the oysters' ability to grow. It may be relevant to conduct further studies on the potential effects of MPs on energy reserves and the immune system of oysters at early stages of development. This study provides new evidences on the environmental risks of realistic high concentrations of MPs on aquatic invertebrates.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148708>.

CRedit authorship contribution statement

Arno Bringer: Investigation, Methodology, Formal analysis, Visualization, Writing – original draft, Funding acquisition. **Jérôme Cachot:** Conceptualization, Methodology, Validation, Writing – review & editing, Supervision. **Emmanuel Dubillot:** Methodology. **Bénédicté Lalot:** Formal analysis, Methodology. **Hélène Thomas:** Conceptualization, Methodology, Validation, Writing – review & editing, Funding acquisition, Supervision.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Arno Bringer received a PhD grant (Comité Régional de la Conchyliculture de la Charente-Maritime CRC17) as well as financial support from the Région Nouvelle Aquitaine and Comité Départemental de la Charente Maritime (CD17) to develop this research. The AQUAECOS project (Amélioration de la QUALité Environnementale sur les zones COncchylicoles des Pertuis Charentais), funded by a partnership with CRC17 and OFB (French Biodiversity Office), contributed to this study. The funding was partly supported by the University of La Rochelle, the University of Bordeaux and the Centre National de la Recherche Scientifique (France). The authors thank France Naissain for the pediveliger larvae as well as Oriane Titeca and Lucie Rees for their proof-reading services.

References

Alimi, O.S., Farner Budarz, J., Hernandez, L.M., Tufenkji, N., 2018. Microplastics and nanoplastics in aquatic environments: aggregation, deposition, and enhanced contaminant transport. *Environ. Sci. Technol.* 52 (4), 1704–1724.

- Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 62 (8), 1596–1605.
- Andrady, A.L., 2017. The plastic in microplastics: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 119 (1), 12–22.
- Auclair, J., Peyrot, C., Wilkinson, K.J., Gagné, F., 2020. Biophysical effects of polystyrene nanoparticles on *Elliptio complanata* mussels. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27 (20), 25093–25102.
- Autá, H.S., Emenike, C.U., Fauziah, S.H., 2017. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environ. Int.* 102, 165–176.
- Bakir, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2014. Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. *Environ. Pollut.* 185, 16–23.
- Bayne, B.L., Ahrens, M., Allen, S.K., D'auriac, M.A., Backeljau, T., Beninger, P., Bohn, R., Boudry, P., Davis, J., Green, T., Guo, X., Hedgecock, D., Ibarra, A., Kingsley-Smith, P., Krause, M., Langdon, C., Lapègue, S., Li, C., Manahan, D., Mann, R., Perez-Paralle, L., Powell, E.N., Rawson, P.D., Speiser, D., Sanchez, J.-L., Shumway, S., Wang, H., 2017. The proposed dropping of the genus *Crassostrea* for all pacific cupped oysters and its replacement by a new genus *Magallana*: a dissenting view. *J. Shellfish Res.* 36 (3), 545–548.
- Bayne, B., d'Auriac, M.A., Backeljau, T., Beninger, P., Boudry, P., Carnegie, R., Langdon, C., 2019. A scientific name for Pacific oysters. *Aquaculture* 499, 373.
- Beaumont, N.J., Aanesen, M., Austen, M.C., Börger, T., Clark, J.R., Cole, M., ... Wyles, K.J., 2019. Global ecological, social and economic impacts of marine plastic. *Mar. Pollut. Bull.* 142, 189–195.
- Beiras, R., Verdejo, E., Campoy-López, P., Vidal-Liñán, L., 2021. Aquatic toxicity of chemically defined microplastics can be explained by functional additives. *J. Hazard. Mater.* 406, 124338.
- Bodoy, A., 1990. Compte-rendu d'activité 1990 de l'Unité de Recherche Régionale Aquacole (URRA) La Tremblade. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00072/18284/15854.pdf>.
- Boucher, J., Friot, D., Boucher, J., 2020. Microplastiques primaires dans les océans: évaluation mondiale des sources. <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2017-002-Fr.pdf>.
- Bour, A., Haarr, A., Keiter, S., Hylland, K., 2018. Environmentally relevant microplastic exposure affects sediment-dwelling bivalves. *Environ. Pollut.* 236, 652–660.
- Bringer, A., Thomas, H., Prunier, G., Dubillot, E., Bossut, N., Churlaud, C., Clérandeau, C., Le Bihanic, F., Cachot, J., 2020a. High density polyethylene (HDPE) microplastics impair development and swimming activity of Pacific oyster D-larvae, *Crassostrea gigas*, depending on particle size. *Environ. Pollut.* 260, 113978.
- Bringer, A., Cachot, J., Prunier, G., Dubillot, E., Clérandeau, C., Thomas, H., 2020b. Experimental ingestion of fluorescent microplastics by pacific oysters, *Crassostrea gigas*, and their effects on the behaviour and development at early stages. *Chemosphere* 254, 126793.
- Bringer, A., Le Floch, S., Kerstan, A., Thomas, H., 2021. Coastal ecosystem inventory with characterization and identification of plastic contamination and additives from aquaculture materials. *Mar. Pollut. Bull.* 167, 112286.
- Buffet, P.E., Zalouk-Vergnoux, A., Châtel, A., Berthet, B., Métais, I., Perrein-Ettajani, H., Poirier, L., Luna-Acosta, A., Thomas-Guyon, H., Risso-de Faverney, C., Guibollini, M., Gilliland, D., Valsami-Jones, E., Mouneyrac, C., 2014. A marine mesocosm study on the environmental fate of silver nanoparticles and toxicity effects on two endobenthic species: the ragworm *Hediste diversicolor* and the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*. *Sci. Total Environ.* 470, 1151–1159.
- Caputo, F., Vogel, R., Savage, J., Vella, G., Law, A., Della Camera, G., Hannon, G., Peacock, B., Mehn, D., Ponti, J., Geiss, O., Aubert, D., Prina-Mello, A., Calzolari, L., 2021. Measuring particle size distribution and mass concentration of nanoplastics and microplastics: addressing some analytical challenges in the sub-micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* 588, 401–417.
- Carpenter, E.J., Anderson, S.J., Harvey, G.R., Miklas, H.P., Peck, B.B., 1972. Polystyrene spherules in coastal waters. *Science* 178 (4062), 749–750.
- Chubarenko, I., Efimova, I., Bagaeva, M., Bagaev, A., Isachenko, I., 2020. On mechanical fragmentation of single-use plastics in the sea swash zone with different types of bottom sediments: insights from laboratory experiments. *Mar. Pollut. Bull.* 150, 110726.
- CNC (Comité National de la Conchyliculture), 2020. <http://www.cnc-france.com/La-Production-francaise.aspx>. (Accessed December 2020).
- Cole, M., Galloway, T.S., 2015. Ingestion of nanoplastics and microplastics by Pacific oyster larvae. *Environ. Sci. Technol.* 49 (24), 14625–14632.
- Connor, P.M., 1972. Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 3, 190–192.
- Di Poi, C., Evariste, L., Serpentine, A., Halm-Lemeille, M.P., Lebel, J.M., Costil, K., 2014. Toxicity of five antidepressant drugs on embryo-larval development and metamorphosis success in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (23), 13302–13314.
- Dupré, M., 2013. Représentations sociales du tri sélectif et des déchets en fonction des pratiques de tri. *Les cahiers internationaux de psychologie sociale* (2), 173–209.
- Dussud, C., Ghiglione, J.F., 2014. Bacterial degradation of synthetic plastics. In *CIESM Workshop Monogr.* 46, 49–54.
- Enya, O., Heaney, N., Injima, G., Lin, C., 2020. Effects of heavy metals on organic matter decomposition in inundated soils: microcosm experiment and field examination. *Sci. Total Environ.* 724, 138223.
- Frère, L., Paul-Pont, I., Rinnert, E., Petton, S., Jaffré, J., Bihannic, I., Soudant, P., Lambert, C., Huvet, A., 2017. Influence of environmental and anthropogenic factors on the composition, concentration and spatial distribution of microplastics: a case study of the Bay of Brest (Brittany, France). *Environ. Pollut.* 225, 211–222.
- Gamain, P., Romero-Ramirez, A., Gonzalez, P., Mazzella, N., Gourves, P.Y., Compan, C., Morin, B., Cachot, J., 2020. Assessment of swimming behavior of the Pacific oyster

CHAPITRE IV – Effets des microplastiques & pesticides aux stades embryon-larvaire et pédivélégère chez l'huître creuse (*C. gigas*)

A. Bringer, J. Cachot, E. Dubillot et al.

Science of the Total Environment 794 (2021) 148708

- D-larvae (*Crassostrea gigas*) following exposure to model pollutants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27 (4), 3675–3685.
- Gardon, T., Reisser, C., Soyeux, C., Quillien, V., Le Moullac, G., 2018. Microplastics affect energy balance and gametogenesis in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Environ. Sci. Technol.* 52 (9), 5277–5286.
- Gardon, T., Huvet, A., Paul-Pont, I., Cassone, A.L., Koua, M.S., Soyeux, C., Jezequel, R., Receveur, J., Le Moullac, G., 2020a. Toxic effects of leachates from plastic pearl-farming gear on embryo-larval development in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Water Res.* 179, 115890.
- Gardon, T., Morvan, L., Huvet, A., Quillien, V., Soyeux, C., Le Moullac, G., Le Luyer, J., 2020b. Microplastics induce dose-specific transcriptomic disruptions in energy metabolism and immunity of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Environ. Pollut.* 266, 115180.
- Glize, P., 1992. Manuel de télécapture de larves d'huître creuse (*Crassostrea gigas*) sur microbrisure. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00081/19175/>.
- Green, D.S., 2016. Effects of microplastics on European flat oysters, *Ostrea edulis* and their associated benthic communities. *Environ. Pollut.* 216, 95–103.
- Green, D.S., Kregting, L., Boots, B., Blockley, D.J., Brickle, P., Da Costa, M., Crowley, Q., 2018. A comparison of sampling methods for seawater microplastics and a first report of the microplastic litter in coastal waters of Ascension and Falkland Islands. *Mar. Pollut. Bull.* 137, 695–701.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2004. Hatchery operation: culture of larvae basic methodology, feeding and nutrition, factors influencing growth and survival, and settlement and metamorphosis. *Hatchery culture of bivalves. A practical manual*. FAO Fish. Tech. Pap. 471, 59–83.
- Hernandez, L.M., Xu, E.G., Larsson, H.C., Tahara, R., Maisuria, V.B., Tufenkji, N., 2019. Plastic teabags release billions of microplastics and nanoparticles into tea. *Environ. Sci. Technol.* 53 (21), 12300–12310.
- Hickman, C.S., 1999. Adaptive function of gastropod larval shell features. *Invertebr. Biol.* 346–356.
- Horton, A.A., Walton, A., Spurgeon, D.J., Lahive, E., Svendsen, C., 2017. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Sci. Total Environ.* 586, 127–141.
- Huang, W., Song, B., Liang, J., Niu, Q., Zeng, G., Shen, M., Deng, J., Luo, Y., Wen, X., Zhang, Y., 2020. Microplastics and associated contaminants in the aquatic environment: a review on their ecotoxicological effects, trophic transfer, and potential impacts to human health. *J. Hazard. Mater.* 124187.
- Julienne, F., Delorme, N., Lagarde, F., 2019. From macroplastics to microplastics: role of water in the fragmentation of polyethylene. *Chemosphere* 236, 124409.
- Kaile, N., Lindivat, M., Elio, J., Thuestad, G., Crowley, Q.G., Hoell, I.A., 2020. Preliminary results from detection of microplastics in liquid samples using flow cytometry. *Front. Mar. Sci.* 7, 856.
- Kershaw, P.J., Rochman, C.M., 2015. Sources, fate and effects of microplastics in the marine environment: Part 2 of a global assessment. Reports and Studies-IMO/FAO/Unesco-IOC/WMO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection (GESAMP) Eng No. 93.
- Koumba, G.B., 2018. Fragmentations chimique et physique de plastiques et microplastiques en eau douce sous irradiation UV-visible. Doctoral dissertation. Université Clermont-Auvergne.
- Li, W.C., Tse, H.F., Fok, L., 2016. Plastic waste in the marine environment: a review of sources, occurrence and effects. *Sci. Total Environ.* 566, 333–349.
- Li, H.X., Ma, L.S., Lin, L., Ni, Z.X., Xu, X.R., Shi, H.H., Yan, Y., Zheng, G.M., Rittschof, D., 2018. Microplastics in oysters *Saccostrea cucullata* along the Pearl River estuary, China. *Environ. Pollut.* 236, 619–625.
- Liebig, J.R., Vanderploeg, H.A., 1995. Vulnerability of *Dreissena polymorpha* larvae to predation by Great Lakes calanoid copepods: the importance of the bivalve shell. *J. Great Lakes Res.* 21 (3), 353–358.
- Lo, H.K.A., Chan, K.Y.K., 2018. Negative effects of microplastic exposure on growth and development of *Crepidula onyx*. *Environ. Pollut.* 233, 588–595.
- Long, M., Paul-Pont, I., Hegaret, H., Moriceau, B., Lambert, C., Huvet, A., Soudant, P., 2017. Interactions between polystyrene microplastics and marine phytoplankton lead to species-specific hetero-aggregation. *Environ. Pollut.* 228, 454–463.
- Lusher, A., Hollman, P., Mendoza-Hill, J., 2017. Microplastics in Fisheries and Aquaculture: Status of Knowledge on their Occurrence and Implications for Aquatic Organisms and Food Safety. FAO.
- 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. *Marine Pollut. Bull.* 12 (9), 305–308.
- Martínez-Sosa, P., Tierney, J.E., 2019. Lacustrine brGDGT response to microcosm and mesocosm incubations. *Org. Geochem.* 127, 12–22.
- Michels, J., Stippkugel, A., Lenz, M., Wirtz, K., Engel, A., 2018. Rapid aggregation of biofilm-covered microplastics with marine biogenic particles. *Proc. R. Soc. B* 285 (1885), 20181203.
- Mottier, A., Pini, J., Costil, K., 2014. Effects of a POEA surfactant system (Genamin T-200®) on two life stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Toxicol. Sci.* 39 (2), 211–215.
- Pacific Coast Shellfish Growers Association, 2011. Pacific Coast Shellfish Growers Association Environmental Codes of Practice for Pacific Coast Shellfish Aquaculture. Pacific Shellfish Growers Association, Olympia (WA), p. 184.
- Phuong, N.N., Poirier, L., Pham, Q.T., Lagarde, F., Zalouk-Vergnoux, A., 2018. Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: location, season and/or mode of life? *Mar. Pollut. Bull.* 129 (2), 664–674.
- PlasticsEurope, 2020. Plastics - the Facts 2020 - an Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data, 2020. PlasticsEurope.
- 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". In: Ifremer (Ed.), Méthodes d'analyse en milieu marin.
- Rani, M., Shim, W.J., Han, G.M., Jang, M., Song, Y.K., Hong, S.H., 2017. Benzotriazole-type ultraviolet stabilizers and antioxidants in plastic marine debris and their new products. *Sci. Total Environ.* 579, 745–754.
- Revel, M., Châtel, A., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Akcha, F., Sussarellu, R., Rouxel, J., Costil, K., Decottignies, P., Cogne, B., Lagarde, F., Mouneyrac, C., 2020. Realistic environmental exposure to microplastics does not induce biological effects in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Pollut. Bull.* 150, 110627.
- Rico-Villa, B., Bernard, I., Robert, R., Pouvreau, S., 2010. A dynamic energy budget (DEB) growth model for Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 305 (1–4), 84–94.
- Rocher, L., 2008. Les contradictions de la gestion intégrée des déchets urbains: l'incinération entre valorisation énergétique et refus social. *Flux* (4), 22–29.
- Rochman, C.M., Browne, M.A., Halpern, B.S., Hentschel, B.T., Hoh, E., Karapanagioti, H.K., Rios-Mendoza, L.M., Takada, H., Teh, S., Thompson, R.C., 2013. Classify plastic waste as hazardous. *Nature* 494 (7436), 169–171.
- Schiapparelli, S., Cattaneo-Vietti, R., Mierzejewski, P., 2004. A "protective shell" around the larval cocoon of *Cephalodiscus densus* Andersson, 1907 (Graptolithoidea, Hemichordata). *Polar Biol.* 27 (12), 813–817.
- Schoof, R.A., DeNike, J., 2017. Microplastics in the context of regulation of commercial shellfish aquaculture operations. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 13 (3), 522–527.
- Sendra, M., Pereiro, P., Yeste, M.P., Mercado, L., Figueras, A., Novoa, B., 2021. Size matters: Zebrafish (*Danio rerio*) as a model to study toxicity of nanoplastics from cells to the whole organism. *Environ. Pollut.* 268, 115769.
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M.E.J., ... Huvet, A., 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (9), 2430–2435.
- Taltec, K., Huvet, A., Di Poi, C., González-Fernández, C., Lambert, C., Petton, B., Le Goic, N., Berchel, M., Soudant, P., Paul-Pont, I., 2018. Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos. *Environ. Pollut.* 242, 1226–1235.
- Talmage, S.C., Gobler, C.J., 2009. The effects of elevated carbon dioxide concentrations on the metamorphosis, size, and survival of larval hard clams (*Mercenaria mercenaria*), bay scallops (*Argopecten irradians*), and Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Limnol. Oceanogr.* 54 (6), 2072–2080.
- Teng, J., Wang, Q., Ran, W., Wu, D., Liu, Y., Sun, S., Liu, H., Cao, R., Zhao, J., 2019. Microplastic in cultured oysters from different coastal areas of China. *Sci. Total Environ.* 653, 1282–1292.
- Teng, J., Zhao, J., Zhu, X., Shan, E., Zhang, C., Zhang, W., Wang, Q., 2021. Toxic effects of exposure to microplastics with environmentally relevant shapes and concentrations: accumulation, energy metabolism and tissue damage in oyster *Crassostrea gigas*. *Environ. Pollut.* 269, 116169.
- Thevenon, F., Caroll, C., Sousa, J., 2014. Plastic debris in the oceans. (IUCN). The Characterization of Marine Plastics and their Environmental Impacts, Situation Analysis Report. IUCN, Gland, Switzerland.
- 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 (5), 653–659.
- USACE, US Army Corps of Engineers, 2015. Programmatic Biological Assessment: Shellfish Activities in Washington State Inland Marine Waters. US Army Corps of Engineers Regulatory Program, Seattle (WA) (208 p).
- Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M.B., Janssen, C.R., 2015. Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environ. Pollut.* 199, 10–17.
- Vignier, J., Soudant, P., Chu, F.L.E., Morris, J.M., Carney, M.W., Lay, C.R., Krasnec, M.O., Robert, R., Volety, A.K., 2016. Lethal and sub-lethal effects of Deepwater Horizon slick oil and dispersant on oyster (*Crassostrea virginica*) larvae. *Mar. Environ. Res.* 120, 20–31.
- Wang, Q., Li, J., Liang, F., Xie, S., Du, X., Deng, Y., 2017. Effects of different substrates on settlement and growth of pearl oyster (*Pinctada maxima*) larvae in hatcheries. *Aquac. Eng.* 77, 15–19.
- Watts, A.J., Urbina, M.A., Corr, S., Lewis, C., Galloway, T.S., 2015. Ingestion of plastic microfibers by the crab *Carcinus maenas* and its effect on food consumption and energy balance. *Environ. Sci. Technol.* 49 (24), 14597–14604.
- Widdows, J., Johnson, D., 1988. Physiological energetics of *Mytilus edulis*: scope for growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 113–121.
- Wright, S.L., Rowe, D., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013. Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Curr. Biol.* 23 (23), R1031–R1033.

RÉSULTATS MAJEURS

- ⇒ Réduction du taux de fixation pour les larves pédivéligères exposées à une forte concentration en MP environnementaux d'origine ostréicoles (10 mg MP.L⁻¹).
- ⇒ Pas d'effets des MP sur le développement et pas d'observations de malformations, lors de la phase de métamorphose.
- ⇒ Retard de croissance pour les huîtres exposées aux MP jusqu'à 28 jours après le début de l'expérimentation (*i.e.* exposition de 7 jours).
- ⇒ Reprise progressive de la croissance pour les huîtres creuses exposées et croissance plus forte que la condition control à la fin du suivi (*i.e.* naissains âgés de 11 mois, J₃₃₈).
- ⇒ Hypothèse : effets potentiels des MP sur les réserves énergétiques larvaires, pouvant impacter le succès de fixation et la croissance à court terme.

**CHAPITRE V – Effets des
microplastiques & pesticides sur les
stades tardifs d’huître creuse (*C. gigas*)**

Préambule

A. Article 6 : Effets de contaminants chimiques commerciaux (microplastiques de polyéthylène (HDPE) et/ou d’un herbicide) sur le comportement valvaire des naissains d’huître creuse (*C. gigas*)

B. Article 7 : Effets des microplastiques environnementaux aquacoles vieillis sur divers stades de vie (survie/fécondation au stade adulte et génération larvaire) chez l’huître creuse (*C. gigas*)

Préambule

Notre futur est plus que jamais lié à la qualité de nos océans. Mieux les connaître, les surveiller, aider à les gérer, est une obligation. Ce Chapitre V présente deux études sur les stades de vie tardifs de l’huître creuse, exposés à différents types de MP (*i.e.* commerciaux seul ou en mélange avec un herbicide & environnementaux ; Figure 40).

Donner, en temps réel, la possibilité aux populations et aux décideurs d’être informé de la qualité du milieu est fondamental (Molluscan Eye, 2020). L’avancée des nouvelles technologies et des projets de recherches interdisciplinaires ont par exemple menée à l’émergence du projet Molluscan Eye, visant à contrôler la qualité de l’eau par le biais du bioindicateur « bivalve ». La valvométrie haute-fréquence a été mise au point par le Dr Jean-Charles Massabuau (UMR CNRS 5805 EPOC de l’Université de Bordeaux) et aussi employée par GÉO-Transfert (filiale de l’Université de Bordeaux). La technique MolluSCAN eye[®] utilise des mollusques pour déterminer la qualité de l’eau. Ce service s’est vu remettre le 2^{ème} prix du concours BEST INNOVATORS 2018 par la société TOTAL.

Le comportement valvaire des huîtres est perturbé par la présence potentielle de micropolluants stressants dans le milieu environnemental. Afin de mieux comprendre les réponses comportementales des huîtres face à une contamination aux microplastiques et pesticides, nous avons mis en place une exposition (24 jours) en conditions contrôlées de laboratoire. Le suivi de l’activité des huîtres creuses par valvométrie HFNI (Haute Fréquence - Non Invasive) a été développé et utilisé à travers différentes études (Tran *et al.*, 2003, 2010 et 2015), par l’équipe de la Station Marion d’Arcachon (UMR EPOC). Dans notre présente étude, les huîtres naissains ont été exposées aux MP de HDPE commerciaux d’une taille de 20-25 μm et à un herbicide régulièrement retrouvé dans les eaux marines des Pertuis Charentais : le Chlortoluron. Dans cette étude, des paramètres tels que la croissance, la chronobiologie, l’amplitude et la durée d’ouverture des valves ainsi que la fréquence des micro-fermetures ont été analysées. Les premiers résultats nous montrent une augmentation du nombre de micro-fermetures chez les huîtres exposées aux MP seuls. Une croissance ralentie a aussi été enregistrée chez les huîtres exposées aux MP de HDPE seuls et au mélange MP + Chlortoluron. Les résultats acquis au cours de cette expérimentation d’exposition ont donné lieu à l’écriture d’un article scientifique, publié dans la revue *Aquatic Toxicology*.

Au fil des années, les techniques de production ostréicole ont changé et se sont orientées vers des outils et matériaux plus faciles à manipuler, moins chères et ayant une durée de vie plus longue. Aujourd’hui, les principaux matériaux utilisés sont en plastiques. De ce fait, il devenait important de tester les potentiels effets des plastiques d’origine ostréicoles sur les bivalves adultes. Pour ce faire, un focus a été mis sur trois plastiques différents, régulièrement utilisés en ostréiculture : la poche de grossissement (PE), la coupelle de captage (PP) et le tube de captage (PVC). Ces macroplastiques ostréicoles ont été prélevés lors de la campagne de collecte organisée durant la fin de l’année 2018 (*cf.* Chapitre III, Article 1). Les plastiques ont ensuite été broyés par l’intermédiaire de l’entreprise Ovide (La Rochelle, France), spécialisée dans le broyage des coquilles d’huîtres afin d’en faire de la microbrissures destinées à la construction de sols bioproducts. Les MP produits font une taille moyenne de 138 μm et ont été utilisés dans le cadre de nos expérimentations. Ces plastiques ont séjourné un certain temps dans l’environnement et ont potentiellement vectorisé des polluants organiques et métalliques durant leur cycle de vie (Leon *et al.*, 2018 et Caruso, 2019). *A contrario* des MP commerciaux, utilisés dans nos études précédentes, ces MP produits à partir de déchets plastiques sont plus représentatifs de ce qui est retrouvé dans l’environnement naturel. Suite à l’étude de

Sussarellu *et al.* (2016) sur les effets des MP de PS sur les huîtres creuses adultes, la gamétogénèse et le stade larvaire, nous avons décidé de reproduire une expérimentation semblable avec les MP dit « environnementaux » et susceptibles d’être en contact des bivalves dans les zones de production. Un suivi sur 2 mois d’exposition a permis aux huîtres adultes de maturées en conditions de laboratoire puis de produire par fécondation *in vitro* des larves-D viables. Un suivi de la croissance et de la mortalité, et des analyses de biomarqueurs ont été réalisés durant ces 2 mois sur les animaux testés. Concernant les larves, issues de parents exposés, des analyses de croissance, développement et activité de nage ont été mises en place, à 24, 48 et 72 h de développement. Les premiers résultats ont montré un effet des MP sur la survie des adultes, exposés durant deux mois. Aucuns effets sur la croissance et les indices de condition n’ont été observés. De plus, des effets significatifs sur le stress oxydant et la réponse immunitaire ont pu être décelés par le suivi de biomarqueurs tels que la GST et la Laccase. La génération F1 au stade larvaire a montré des retards de croissance ainsi que des anomalies de développement et de comportement. Avec la volonté des professionnels de la filière conchylicole, de changer leurs pratiques, le Comité Régional Conchylicole est vivement intéressé par l’analyse des effets des plastiques utilisés dans la profession, sur le cycle de développement des bivalves et notamment des huîtres creuses (*C. gigas*) et les potentiels effets intergénérationnels de ces contaminants chimiques.

Cette étude est en cours de préparation pour une publication prochaine sous forme d’article scientifique dans le journal, *Environmental Pollution*.

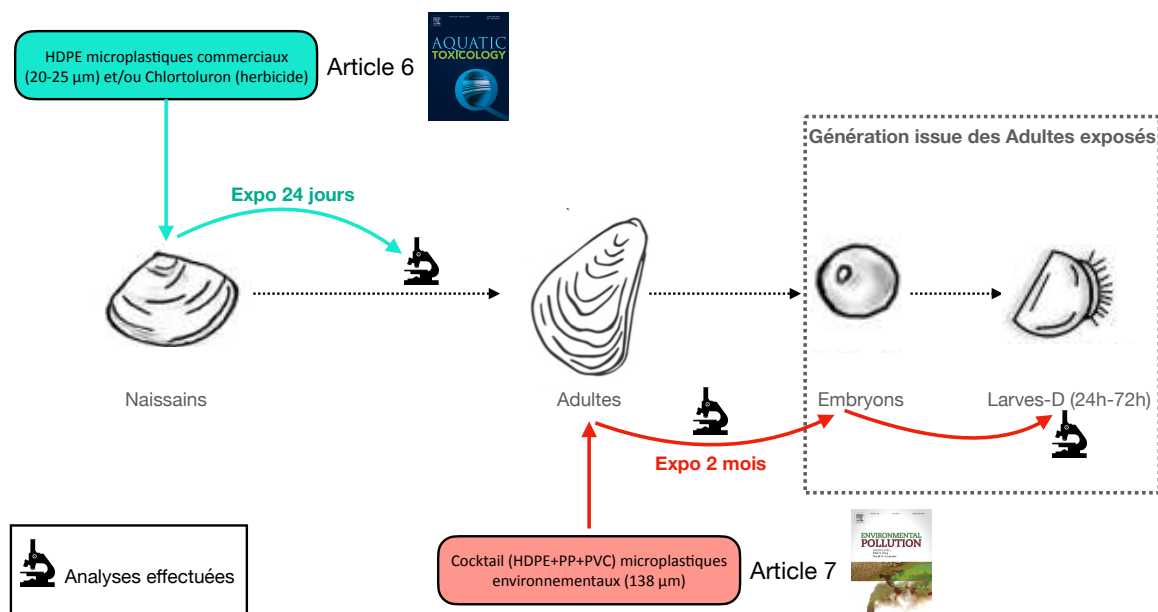


Figure 40. Schéma récapitulatif des travaux effectués sur les stades naissains et adultes, exposés aux MP et pesticide.

L’exposition, d’huîtres naissains, aux microplastiques de polyéthylène (HDPE) seuls ou en mélange avec un herbicide a induit des effets sur l’activité valvaire et la croissance. De plus, les microplastiques environnementaux, ont conduit à des effets subchroniques sur une exposition longue (2 mois) au stade adulte et sur les premiers stades de développement de la génération larvaire parentale, chez l’huître (*C. gigas*).

A. Article 6 : Effets de contaminants chimiques commerciaux (microplastiques de polyéthylène (HDPE) et/ou d’un herbicide) sur le comportement valvaire des naissains d’huître creuse (*C. gigas*)

A travers cet article, nous nous sommes intéressés aux variations de comportement valvaire, chez les naissains d’huîtres creuses (*Crassostrea gigas*), durant une exposition en conditions contrôlées de laboratoire à différents contaminants. Des microplastiques (MP) de polyéthylène (HDPE) commerciaux de 20-25 μm ont été testés à une concentration de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Nous avons décidé de tester le PE car particulièrement présent dans les milieux côtiers et quotidiennement utilisé par les professionnels ostréicoles. De plus, la gamme de taille choisie inférieure à 40 μm est retrouvée régulièrement dans les échantillonnages en milieu naturel (Enders *et al.*, 2015). La deuxième condition d’exposition a consisté à tester l’effet du Chlortoluron, un herbicide régulièrement retrouvé dans les eaux des Pertuis Charentais, sur les naissains d’huître creuse. L’exposition sur les animaux a considéré une concentration de $30 \mu\text{g.L}^{-1}$. Cette concentration est plus élevée que les concentrations environnementales décrites dans le milieu naturel mais cet essai expérimental nous permettra de mieux visualiser les potentiels effets toxiques de ce phytosanitaire, lors de potentiels pics d’épandage agricole décrits sur le territoire des Pertuis Charentais. La dernière condition d’exposition a consisté à étudier l’effet du mélange MP et Chlortoluron, avec les mêmes concentrations que décrites ci-dessus, sur les naissains d’huître creuse. Après une phase d’acclimatation de 7 jours, les animaux ont été exposés pendant 24 jours aux différentes conditions d’expériences. Les protocoles et dispositifs expérimentaux sont décrits dans l’article ci-après. Les huîtres creuses ($n=8/\text{conditions}$) ont été équipées de deux électrodes (une sur chacune des valves), reliées à un valvomètre à haute fréquence et directement connectées à deux ordinateurs pour réaliser l’acquisition des données. La valvométrie nous a permis d’analyser plusieurs paramètres : la fréquence des micro-fermetures, la durée et l’amplitude d’ouverture des valves, la croissance et les rythmes chronobiologiques. Les premiers résultats montrent un effet des MP seuls avec une augmentation du nombre de micro-fermetures à partir du 6^{ème} jour d’exposition. De plus, nous avons observé une diminution du temps d’ouverture des valves, chez les huîtres exposées aux MP. Les conditions MP seul et mélange des deux contaminants (MP et Chlortoluron commerciaux) ont montré une croissance diminuée dès les premiers jours d’exposition. Notre étude est la première à mettre en lumière des effets des MP sur le comportement valvaire chez l’huître creuse en conditions contrôlées de laboratoire. Les MP sembleraient avoir un effet mécanique sur les naissains d’huîtres et déclencherait comme un « système d’alarme comportemental » et une réponse au stress chez les bivalves marins.

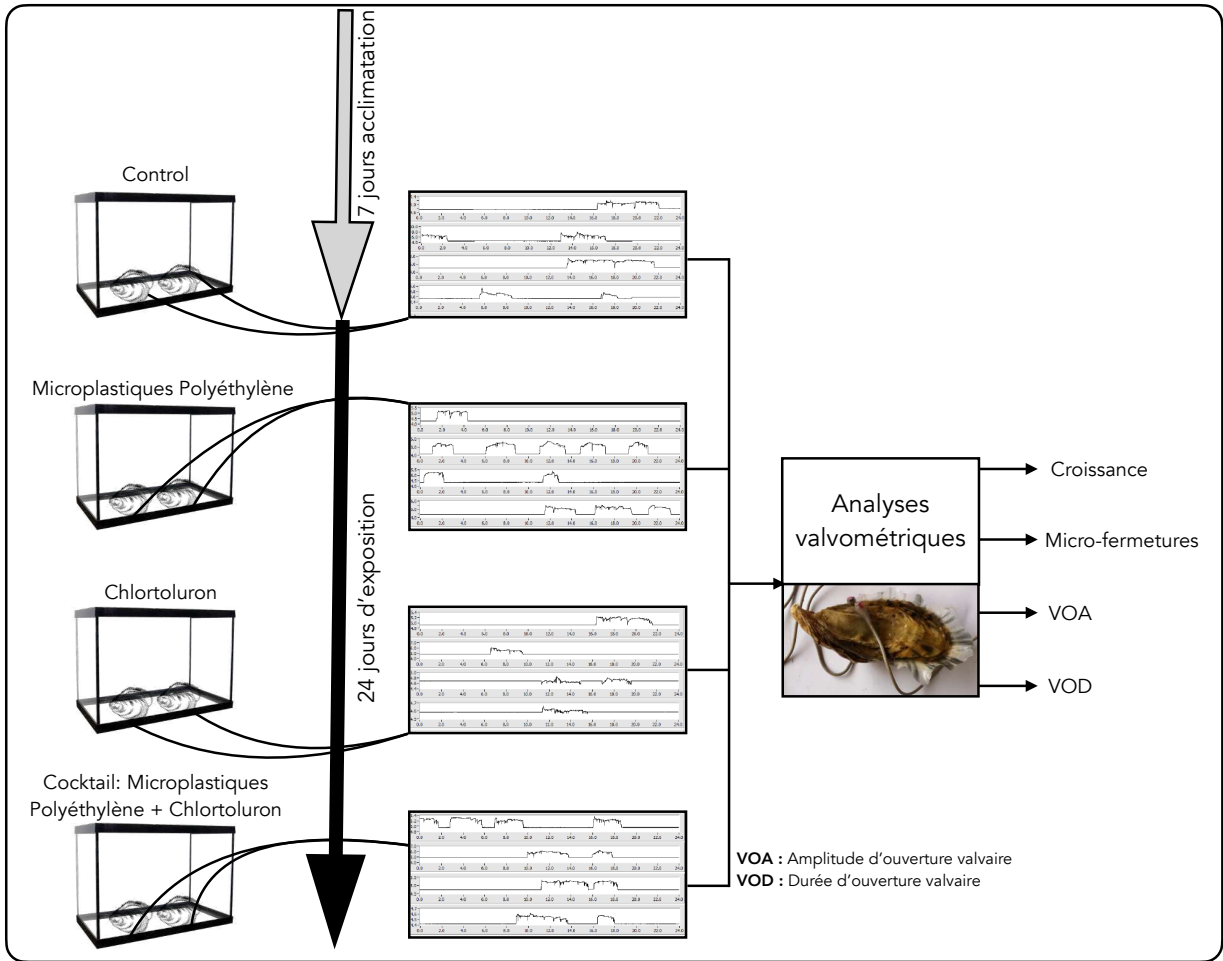


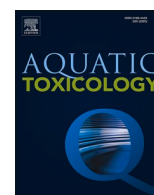
Figure 41. Schéma résumant les travaux réalisés dans le cadre de l'Article 6.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqtox

Subchronic exposure to high-density polyethylene microplastics alone or in combination with chlortoluron significantly affected valve activity and daily growth of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*

Arno Bringer^{a,*}, Hélène Thomas^{a,1}, Emmanuel Dubillot^a, Stéphane Le Floch^c, Justine Receveur^c, Jérôme Cachot^{b,1}, Damien Tran^b

^a Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, F-17042 La Rochelle Cedex 01, France

^b Université de Bordeaux, CNRS, EPOC, EPHE, UMR 5805, F-33600 Pessac, France

^c Cedre, 715 Rue Alain Colas, 29218 Brest Cedex 2, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Bivalve molluscs
Experimental biomonitoring
Microplastics
Pesticide
Valve behaviour
Growth

ABSTRACT

Nowadays, pesticides and microplastics (MPs) are commonly found in coastal waters worldwide. Due to their widespread use, their persistence and toxicity, they may induce adverse effects on physiology and behaviour of marine organisms such as the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). This study explored the growth and valve activity of juvenile oysters exposed for 24 days to two frequently detected pollutants in the Pertuis Charentais (South West, France): a herbicide (chlortoluron, 85 $\mu\text{g.L}^{-1}$) and high-density polyethylene microparticles (HDPE 20-25 μm , 112 MP.mL^{-1}) alone or in combination (cocktail condition; 97 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of chlortoluron + 108 MP.mL^{-1}). The valve activity of juvenile oysters recorded by using a High Frequency and Non-Invasive valvometer (HFNI) was characterized by three parameters: the number of valve micro-closures (VMC), the Valve Opening Amplitude (VOA), and the Valve Opening Duration (VOD). Additionally, daily shell growth and the oyster daily rhythm were assessed. The exposure to MPs of oysters led to a significant increase of VMC and a decrease of VOD and shell growth. The exposure to chlortoluron showed a significant increase of VOA and a decrease of VMC. In combination with MPs, chlortoluron still increased VOA and decreased VMC but also reduced the shell growth. Chronobiological analysis did not reveal any effects on the daily rhythm of both contaminants. This work highlighted significant effects of high environmental concentrations of MPs and Chlortoluron on the behaviour and growth of the Pacific oyster.

1. Introduction

With a production of 135,000 tons of bivalves in 2017, including 81,000 tons of oysters, France is the 2nd most important producer of bivalves in Europe (France Agrimer, 2020). Shellfish farming turnover was estimated at 774 million euros in 2019 (CNC (Comité National de la Conchyliculture) 2020). The Pertuis Charentais area (South West Atlantic coast, France) represents 23 % of the national oyster production (CNC (Comité National de la Conchyliculture) 2016). Since 2010, juvenile and adult oysters are facing excess mortality rates, affecting 70 to 80 % of oyster farms located in the Atlantic coast (Soletchnik *et al.*, 2018; Lucasson, 2018 and (Girard and Agúndez, 2014). The quality of the coastal waters, where bivalves are grown, is a source of concern today.

The increased use of plastics (Phuong, 2018) in aquaculture generates MPs pollution, which could affect physiology of bivalves (e.g. growth, immune status, reproduction) (Sussarellu *et al.*, 2016; Paul-Pont *et al.*, 2018; Gardon *et al.*, 2020). Scientific studies are working to offer a growing number of toxicological tests on emerging contaminants such as MPs and pesticides, in order to better understand the modes of action of these pollutants (Wang *et al.*, 2020; Bhagat *et al.*, 2020).

Plastics are widely used polymers, the use of which has vastly expanded over the past decades (Xu *et al.*, 2017). In 2019, nearly 370 million tons of plastics were produced across the world, and in Europe, plastics production reached almost 58 million tons (PlasticsEurope, 2020). In Europe, 80 % of the plastic production is accounted for by six main polymers (PlasticsEurope, 2016): polypropylene (PP), high and

* Corresponding author.

E-mail address: arno.bringer1@univ-lr.fr (A. Bringer).

¹ Equal contributions

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105880>

Received 2 March 2021; Received in revised form 26 May 2021; Accepted 27 May 2021

Available online 30 May 2021

0166-445X/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

low-density polyethylene (HDPE and LDPE), polyvinyl chloride (PVC), polyurethane (PUR), polyethylene terephthalate (PET), and polystyrene (PS). It is estimated that rivers carry between 70 % and 80 % of plastic waste, most of which ends up in oceans (Horton et al., 2017). Through wave activities, UV degradation and physical abrasion, larger plastic pieces in the marine environment are fragmented, resulting in the production of MPs and nanoplastics (NPs) (Born and Schüttrumpf, 2019; Diaz-Mendoza et al., 2020). MPs are plastic particles ranging from 1 µm to 5 mm (Cole et al., 2011; Wagner et al., 2014). The ingestion of MPs was observed in numerous aquatic species, notably in filter-feeding bivalves at different life stages (Rist et al., 2019; Ward et al., 2019; Betsill et al., 2019; Bringer et al., 2020b). It can cause several harmful effects at the physiological and tissue levels, affecting the growth and reproduction of bivalves (Lee et al., 2013; Sussarellu et al., 2016; Lo and Chan, 2018), as well as physical injuries (Gall and Thompson, 2015) and reduced eating behaviour (Cole and Galloway, 2015). At the individual level, this can lead to the depletion of energy reserves (Wright et al., 2013 and Xu et al., 2017), larval development, leading to delays and malformations, (Tallec et al., 2018), and swimming activity (Bringer et al., 2020a). Toxic effects are mainly observed following exposures to high levels of MPs compared to environmental concentrations reported in the literature (Paul-Pont et al., 2018). However, most of environmental studies consider size classes of MPs > 333 µm (Song et al., 2015; Zhao et al., 2014; Baldwin et al., 2016) and thus the concentrations of small MPs is not taken into account. Environmental concentrations ranging from 0.002 to 0.5 mg MP. L⁻¹ (> 10 µm) have been detected in surface water in different areas of the world (Eriksen et al., 2013; Enders et al., 2015).

Chlortoluron, which belongs to substituted urea family, is one of the most commonly used herbicides in wheat and barley crops. Chlortoluron inhibits photosynthesis and affects phytoplankton (Valiente Moro et al., 2012). In 2017, a maximum value of 0.18 µg.L⁻¹ was detected at the mouth of a river (surface water) flowing into the Pertuis Charentais (Leonard, 2017). A concentration of 0.14 µg.L⁻¹ of chlortoluron was detected in 2018, at the mouth of the Charente (Pertuis Charentais), close to oyster farms (Action program, 2018). The herbicide family has already been studied in oysters, showing effects at the early stages of development on survival and development (Mottier et al., 2013; Gamain et al., 2017; Behrens et al., 2016; Mai et al., 2013), during gametogenesis with genotoxic effects (Akcha et al., 2020), as well as by modulating molecular and biochemical parameters (Lee et al., 2017).

The valve activity on the oyster was measured using an HFNI (High Frequency Non-Invasive) valvometer biosensor (Andrade et al., 2016). This biosensor has made it possible to monitor behavioural responses of bivalves when exposed to stress events, such as contamination. Assessing the valve activity behaviour through an HFNI valvometer has already been used to study contaminants, including trace metals (Tran et al., 2004a) (Tran et al., 2007), radionuclides (Tran et al., 2004b) (Tran et al., 2005) and harmful algae (Tran et al., 2010) (Tran et al., 2015) (Haber Korn et al., 2011). To our knowledge, no valvometric behavioural study, under laboratory conditions, has been carried out to assess the consequences of exposure to pesticides and MPs. However, in recent years, several articles have underlined the relevance of modelling and analysing the behaviour of marine animals under experimental conditions mimicking environmental conditions (Mat et al., 2014; Ahmed et al., 2015). In the present study, under controlled conditions and to characterize the behaviour of the oyster valve, three parameters were recorded: VMC, VOA and VOD. In addition, a chronobiological analysis of the daily rhythm of the valve was carried out as well as a measurement of the daily growth. The aim of this study was to better understand the potentially disrupting effects of emerging contaminants (MPs and pesticides) alone or in cocktail on the daily growth and the valve activity of Pacific juveniles oysters (*C. gigas*).

2. Material and methods

2.1. Individuals and acclimatization

Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Bayne et al., 2019; Bayne et al., 2017), were kindly provided by a hatchery (™France Naissain, France). This experiment was conducted on 12-month-old juvenile oysters (59.5 ± 1.1 mm, 22.6 ± 1 g total mass) during autumn season (after the period of gametogenesis and fertilization). Four homogenous groups of diploid oysters (n = 8/condition) were chosen. Each group was distributed in a 37.5 L tank. Each tank was continuously filled with oxygenated seawater coming from a large buffer tank. For the experiment, oysters were acclimated for 7 days in UV-treated running (78.3 L.h⁻¹) seawater before being exposed to pollutants for 24 days. Seawater was taken from the Pertuis Breton (South West, France), which is directly connected to the experimental area, and filtered using a 50 µm and 10 µm membrane in order to eliminate debris. Filtered seawater (FSW) was used for experimental exposure tanks. The FSW temperature in tanks was 16.8 ± 0.4 °C and the salinity 35.7 ± 0.2. The temperature value and salinity were measured daily. Throughout the experiment, nitrates, nitrites, chlorines and pH (7.3 ± 1.0) were regularly measured to ensure consistency. A continuous bubbling and a brewing system were set up. Throughout the duration of the experiment, a natural photoperiod was established. In addition, the oysters were fed thanks to the natural presence of phytoplankton in the seawater used. During the acclimatization and experimental periods, no mortality events were recorded. Nevertheless, failures of the valvometric signal recording, due to an electrical leak at the electrode level during the study, reduced the number of oysters studied to respectively n = 7 in the control, n = 6 in the chlortoluron, n = 8 in the MPs exposure, and n = 5 for the cocktail conditions.

2.2. Experimental procedure

MPs were used (™HDPE 20-25 µm MPP-1241, density 0.96, Micropowders Inc. USA) and chlortoluron (™Pestanal, analytical standard, 45400-250MG-R reference) was purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St. Quentin Fallavier, France). The solutions containing MPs and chlortoluron were prepared beforehand in glass test tubes. The stock solutions, prepared in pure Mili-Q-water, had an MPs concentration of 10 mg MP.L⁻¹ and a chlortoluron concentration of 3 mg.L⁻¹. They were kept cool in the dark in order to prevent bacterial growth. The stored solutions were then diluted in FSW to lower the concentrations to 10 µg MP.L⁻¹ and 30 µg.L⁻¹ respectively. After the 7-day acclimatization period, the pollutants were added to the experimental system, in the buffer tanks. Every two days, 30 % of the FSW in the buffer tank was renewed, for the wellbeing of the oysters. Water stirrers were used in each buffer tank in order to homogenize the plastic microparticles as much as possible in the seawater. Polystyrene foams protected tanks and equipment to reduce vibrations from electrical equipment. In addition, capacitance chambers were installed to reduce vibrations from the air pipes bringing oxygen into FSW, during the behavioural analyses (Fig. S1).

2.3. HFNI valvometry analysis

To assess the pollutant impact (MPs and chlortoluron) on the oysters' valve behaviour, the valve activity was recorded using a High Frequency Non-Invasive (HFNI) valvometer. The oysters were equipped with light electromagnetic electrodes coated in resin (≈ 1 g), which were glued to the same spot on both shells. The electrodes were attached to free covered stranded copper wires (diameter: 0.98 mm, length: 120 cm), sending data to a device. The induced voltage, measured by biosensors, varied according to the distance between the electromagnetic electrodes. For each oyster, a measure was taken every 4.8 sec., i.e. 18 000 data/oyster/day. For more details, see Tran et al. (2015) and Andrade

et al. (2016). Bivalve behaviour was monitored 24/24 hours and 7/7 days (Tran et al., 2004a and Haberkorn et al., 2011). The biosensor used consists of very sensitive electrodes, resulting in minimal experimental constraints. The valve activity was recorded non-stop, both for the 7-day acclimatisation and the 24-day experimental periods. Then, the data were analysed using the LabView 8.6 software (™National Instruments, Austin, TX, USA).

Three behavioural parameters were assessed: daily and hourly VMC, VOA and VOD. Micro-closures (VMC) designate partial and rapid closures followed by a re-opening of the valves. A VOA equal to 100 % and 0 % meant that the valves were opened at maximal and minimal amplitudes, respectively, during the studied duration. Finally, A VOD equal to 100 % and 0 % meant that the valves were opened or closed, respectively, during the studied duration. Mean daily VMC, VOA and VOD were the average results of the hourly values recorded for each oyster. The HFNI biosensor enabled individual measurement of the daily growth of shells by calculating the minimal distance between the electrodes when the oyster valves were closed. For instance, in bivalve molluscs, calcification appears on internal surface of the shell. Thus, the cumulative daily shell length growth was calculated as indicated: minimal distance between electrodes (day (n) – day (1)) x 100 % (n/24), n representing the number of the day. To obtain the actual shell length growth, manual measurements (digital caliper, ± 0.1 mm) were performed at the start (D₀) and at the end (D₂₄) of the experiment. The difference in mm equals 100 % growth. Growth rates have been measured using the HFNI valvometer. The calcification in bivalves occurs in the mantle cavity all over the shell’s internal structure (Fig. 4). When the daily calcium layer is deposited, the minimum distance between the electrodes glued to the shells increases, providing a good proxy for growth (Schwartzmann et al., 2011; Berge et al., 2015).

To study the daily biological rhythm ($\tau = 24$ h) of the valve activity, a statistical chronobiological analysis was conducted using the software Time Series Analysis Serial Cosinor 6.3 (<http://www.euroestech.com>). Several steps were required to validate a significant biological rhythm (Gauthiere et al., 2005). The first step included verifying the data quality of biological and physical phenomena. The absence of random distribution in data was assessed using an autocorrelation diagram, while the absence of a stationary phenomenon was calculated with a partial autocorrelation function (Box et al., 2015). The second step involved searching significant periodicity ($p = 0.95$), using the Lomb and Scargle periodogram (Scargle, 1982). The third step added a modelling and statistical validation using the Cosinor model, which is a cosine function included in a regression model (Nelson et al., 1979). Two tests validated the model, and thus, the existence of a biological rhythm. The elliptic test (Bingham et al., 1982) had to be rejected, leading to a probability of null amplitude hypothesis of < 0.05. When conditions were met, a chronobiometric parameter computed the Percent Rhythm (PR, %), which is the percentage of cyclic behaviour determined by the Cosinor model.

2.4. Contaminant analysis

Chlortoluron and MPs concentrations were measured twice: on day 5 (D₅, 5 days after the start of the experiment) and day 24 (D₂₄, the last day of the experiment). Water samples (V = 100 mL/replicate with n = 3 replicates) and oyster tissues (n = 7/condition) exposed to both chlortoluron and the cocktail solution were assayed using the QuEChERS method (Quick Easy Cheap Efficient Rugged and Safe, (Anastassiades et al., 2003) and the SBSE analysis (Stir Bar Sorptive Extraction, (Baltussen et al., 1999) (Pfannkoch et al., 2010 and from the AOAC 2007.01 method of Lehotay, 2007).

To analyse the oyster tissue and determine chlortoluron concentrations, 3 g of oyster tissue was spiked with an internal standard solution. Milli-Q water was added to the solution to reach 15 g. After being vortexed once, samples were added with 15 ml of acetonitrile (Pestnorm, VWR Chemicals), before being vortexed a second time (1 min, 160 rpm).

Then, 6 g of magnesium sulphate (anhydrous, BioReagent, Sigma-Aldrich) and 1.5 g of sodium acetate (anhydrous, >99 %, Sigma-Aldrich) were added to the samples, which were then vortexed again (10 min, 250 rpm) and centrifuged (5 min, 4700 rpm, 5 °C). Ten mL of the supernatant containing the organic phase with acetonitrile was collected and mixed with 40 ml of sodium carbonate (0.1 M, ≥ 99.7 %, Sigma-Aldrich). A Twister (magnetic stir bar coated with polydimethylsiloxane) was inserted into the bottle. SBSE extraction was performed (16 h, 700 rpm), in the dark). After the completion of the extraction, the bars were rinsed off with Milli-Q water before being dried on a fabric.

To analyse the chlortoluron seawater exposure samples, 10 mL of methanol (Pestnorm, VWR Chemicals) was put in a bottle containing the internal standard solution. 100 mL of seawater and a Twister were then added. Protected from light, the solution was stirred for 16 hours at 700 rpm.

Chlortoluron was quantified by gas chromatography (HP 7890N equipped with a Combipal MPS2 multifunction injection system, 300 °C, Gerstel, Switzerland) and mass spectrometry (GC/MS), coupled with a TDU (Thermal Desorption Unit, Gerstel: 50 °C (0.5 min) to 280 °C (6 min) at 15 °C/min) and a temperature-programmed injector (Cooled Injection System, Gerstel: -10 °C (0.05 min) to 300 °C (10 min) at 12 °C/s). The temperature was programmed from 70 °C (5 min) to 150 °C, increasing by 20 °C/min, then to 320 °C (5 min) increasing by 7 °C/min. The carrier gas, helium, was at a constant flow rate (1 mL/min). The capillary column was a 5-ms RXi (Restek, Bellefonte, USA): 30m x 0.25mm ID x 0.25µm (film thickness) column. Through tandem mass spectrometry (Agilent 7000 Triple Quad), a chromatograph and a detector were coupled together. The quantitative analysis of chlortoluron was performed in MRM mode by internal calibration. Two transitions for each compound were set up: the first to quantify the molecules and the second to confirm their nature. The second step defined the nature by calculating the qualifier/quantifier ratio and comparing them to the reference values of pure compounds. The acquisition frequency of each fragment was of 2 cycles/s.

Due to the small sizes of particles (20-25 µm), the MPs analysis in oyster tissues was not performed.

According to the protocol described in Bringer et al. (2020a) (Bringer et al., 2020b), flow cytometer (Attune Acoustic Focusing Cytometer) enabled a quantitative analysis of MPs in the 10 µg MP.L⁻¹ condition. 2 mL samples were prepared with the MPs solution (n=8/condition). The samples were vortexed (StarLab Vortex IR, 12,000 rpm for 20 s) before being transferred into the cytometer to homogenise the solution. 300 mL were taken to carry out a flow cytometry analysis. Calibration was conducted to reach an analysis rate of 500 mL.min⁻¹ and a saturation of maximum 10,000 particles detected. The blank obtained enabled the removal of background particles (naturally present in seawater). Using seawater filtered at 0.2 µm, a first calibration step was conducted to select the < 200-time detected particles.

2.5. Statistics

All data were expressed as means ± standard error of the mean (SEM). Treatment differences were determined using a one-way analysis of variance (ANOVA), when both criteria of homogeneity of variance (Levene’s test) and normality of distribution (Shapiro-Wilk) were met. When these requirements were not met, a statistical analysis was performed using the non-parametric Kruskal-Wallis test, followed by the Nemenyi post-hoc test for pair comparisons. Statistical comparisons were made on the means of each parameter according to the exposure conditions. Significant difference was accepted when the p -value was < 0.05. The statistical analysis was conducted using R.

3. Results

3.1. Pollutant exposure

Chlortoluron concentrations were determined in exposed waters (Table 1.a). Under control conditions, water contamination increased over time. On D₂₄ (condition chlortoluron vs cocktail), an increase in the concentration of chlortoluron was noted. The concentration of chlortoluron in the cocktail condition was slightly higher than for the condition of chlortoluron alone (at D₅ and D₂₄). In both cases, the measured concentrations were well above the theoretical concentration of 30 µg.L⁻¹. The concentrations of chlortoluron measured in the soft bodies of oysters are shown in Table 1.a. No trace of herbicide was detected in control individuals. In exposed individuals however, chlortoluron was measured at both sampling times D₅ and D₂₄, with respectively 226.9 ± 69.5 and 229.5 ± 92.0 ng.g⁻¹ for chlortoluron conditions; 366.0 ± 132.7 and 242.3 ± 199.6 ng.g⁻¹ for cocktail condition.

The concentrations of MPs in FSW (Table 1.b) were above the targeted concentration of 10 µg of MP.L⁻¹. The approximate actual concentrations calculated in this study were determined using additional data from a previous study (Bringer et al., 2020a), which used and tested the same commercial MPs (HDPE, 20-25 µm), at different concentrations. The concentrations of MPs were stable over time (D₅ and D₂₄) and similar between the exposure conditions (MP alone vs cocktail). In addition, an analysis of the particles in the control FSW was performed and no MPs were detected.

3.2. Valve activity of oysters

3.2.1. Valve micro-closures (VMC)

The number of VMC per day and per individual is shown on Fig. 1a. Compared to the other conditions, the daily VMC in MPs over the 24-day experiment highlighted a significant increase ($p < 0.001$). The mean VMC for MPs was 2.9 times higher than for the control condition (Fig. 1b). Fig. 1b clearly showed a significant decrease in the chlortoluron and cocktail VMC, compared to the control condition VMC. The mean VMC for chlortoluron and cocktail conditions were respectively

40.3 % and 58 % lower compared to the control condition.

3.2.2. Valve opening amplitude (VOA)

In terms of VOA, the 24-day experiment underlined contrasting results between the MPs condition and the two other conditions containing herbicides (Fig. 2a, b, c). Although the VOA was similar for the MPs and control conditions (with no significant differences), it was significantly higher in chlortoluron and cocktail conditions compared to control (both $p < 0.001$)

Over the entire experiment, the mean VOA displayed major differences between the four conditions ($p < 0.001$). Compared to the control condition, a significant increase in mean VOA of 18.2 % and 22.3 % were respectively noted for the chlortoluron alone and cocktail conditions (Fig. 2d).

3.2.3. Valve opening duration (VOD)

Over the 24-day experiment (Fig. 3 a, b, c), the VOD for both the chlortoluron and cocktail conditions remained unchanged. In contrast, the VOD for the MPs condition was significantly decreased compared to the control condition. Indeed, over the entire experiment, the mean VOD highlighted a significant decrease ($p < 0.001$) of 5.1 % for the MPs condition, compared to the control (Fig. 3d).

3.2.4. Chronobiological analysis

Through a statistical chronobiological approach, a daily rhythm analysis was performed using the Cosinor method. When comparing the three conditions to the control, no significant disruption of VOA rhythm was observed. Figure S2 displays, for each condition, the spectral analysis of the valve activity (Lomb and Scargle periodogram). This highlighted a significant periodicity in the valve behaviour. The daily mean VOA for all conditions were: $\tau = 24.0 \pm 0.1$ (control); 23.8 ± 0.1 (chlortoluron); 23.9 ± 0.1 (MPs); 23.9 ± 0.1 h (cocktail). Periodicities were observed using the Cosinor model, which validated the presence of a daily rhythm for all conditions ($p < 0.0001$ for all conditions). The percent rhythms (PR) between conditions were quite close, except for chlortoluron, which had a lower PR. PR were 46.4 % (control), 32.3 % (chlortoluron), 42.8 % (MPs), and 45 % (cocktail).

3.2.5. Shell growth

The Fig. 4a displays the cumulative daily shell growth, monitored for 24 days. No significant difference was observed between the control and chlortoluron conditions ($p = 0.07$) but the p -value is close to the statistical significance. In contrast, over 24 days, oysters exposed to the MPs and cocktail conditions demonstrated a lower shell growth. Indeed, after the 24-day period, the mean shell length growth for the MPs and cocktail conditions respectively was reduced to 50.4 % ($p < 0.0001$) and 42.7 % ($p = 0.021$), in comparison with the control (Fig. 4b). The oyster shell growth for the MPs and cocktail conditions were also lower than observed following exposure to chlortoluron alone.

3.2.6. Summary of the main results

The actual concentrations measured on D₂₄ of the FSW exposure (for MPs, chlortoluron alone and cocktail), are presented in Table 2. In the remainder of this present study, the actual concentrations are expressed. In our work, the analysis validated the existence of a daily rhythm of oysters' valve activity for all tested conditions. No significant differences in chronobiological rhythms were noted between the four conditions tested. Regarding the behavioural parameters, our results suggest that, when exposed to chlortoluron, the oysters' valve activity was significantly disrupted (Table 2). Indeed, in comparison with the control condition, a decrease in the number of VMC and an increase in VOA were noted. Following MPs exposure, a significant increase in VMC and a decrease in VOD and growth were observed. Concerning the cocktail condition, a decrease in VMC and growth, and an increase in VOA were highlighted. Depending on the exposure conditions, the valve behaviour of oysters responded differently.

Table 1

(a) Theoretical and measured chlortoluron (herbicide) concentrations in oyster tissues (dry weight) and seawater for three conditions: control, chlortoluron and cocktail (MPs + chlortoluron). Values are mean ± SEM for n=7/condition for oyster tissues and n=3/condition for water samples. (b) Theoretical, measured MPs and approximate concentrations in three conditions: control (n=12), MPs (n=8), and cocktail (MPs + chlortoluron, n=8). Values are mean ± SEM.

A				
Conditions	Day of Sample	Theoretical (µg.L ⁻¹)	Water exposure (µg.L ⁻¹)	Oyster tissues (ng.g ⁻¹)
control	Day 5	0	0.06 ± 0.0	0
	Day 24	0	1.5 ± 0.9	0
chlortoluron	Day 5	30	58.3 ± 25.1	226.9 ± 69.5
	Day 24	30	85.5 ± 17.0	229.5 ± 92.0
cocktail	Day 5	30	74.6 ± 4.9	366.0 ± 132.7
	Day 24	30	96.6 ± 25.8	242.3 ± 199.6

B				
Conditions	Day of Sample	Theoretical (µg MP.L ⁻¹)	Measured (MP.mL ⁻¹) 20-25 µm size	Approximate concentrations (µg MP.L ⁻¹)
control	Day 5	0	0	0
	Day 24	0	0	0
MPs	Day 5	10	93.9 ± 31.2	47
	Day 24	10	111.7 ± 11.5	56
cocktail	Day 5	10	124.4 ± 30.3	60
	Day 24	10	107.6 ± 49.3	54

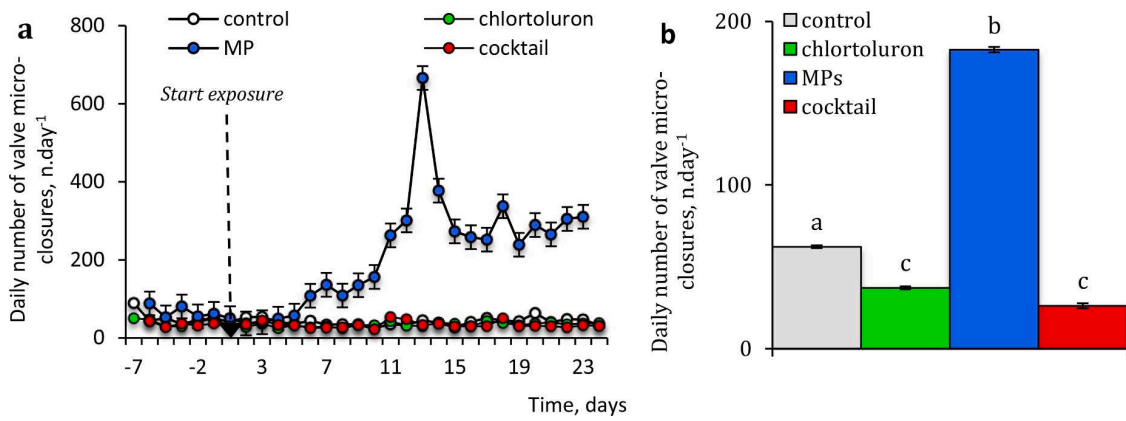


Fig. 1. (a) Daily VCM showing the 7-day acclimatisation and the 24-day exposure periods. (b) Histograms of mean VCM ± SEM for the 24-day exposure period. The different conditions are: control (white, n = 7), chlortoluron alone (green, n = 6), MPs alone (blue, n = 8), and cocktail (red, n = 5). Different letters indicate significant differences between concentrations ($p < 0.05$).

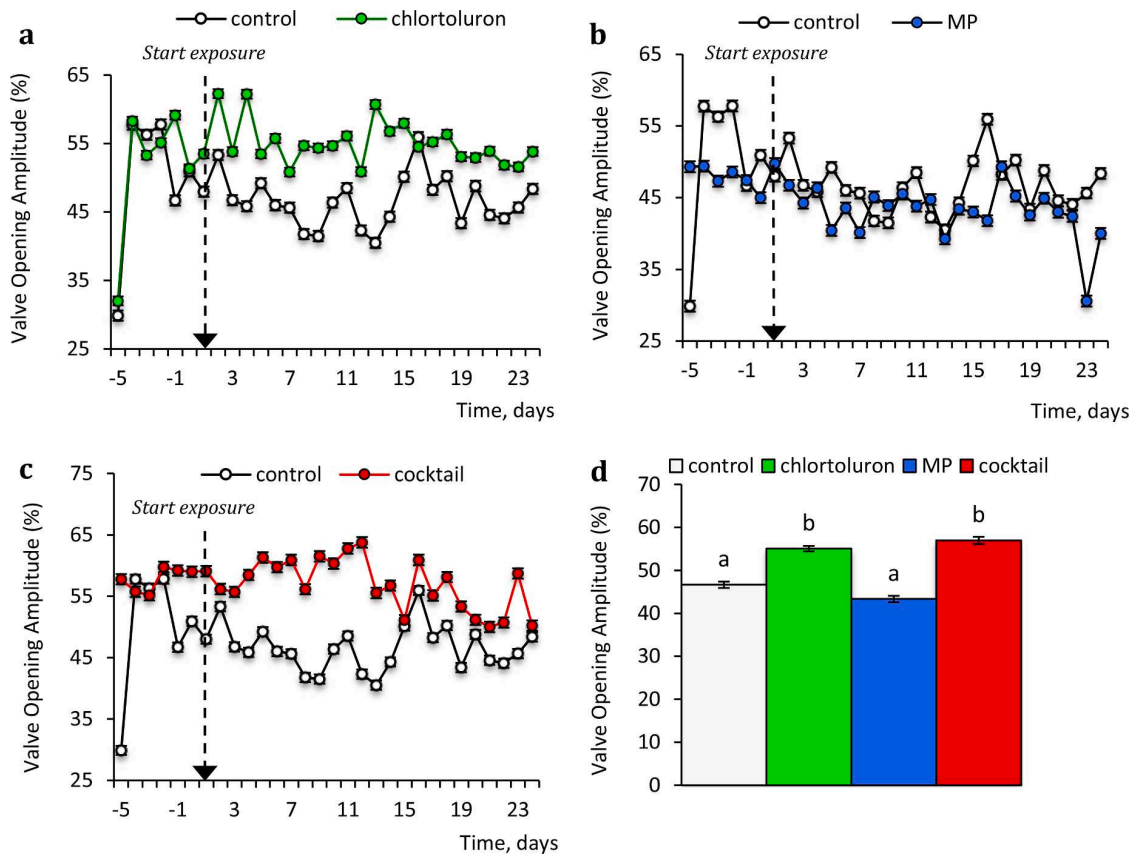


Fig. 2. Valve Opening Amplitude (VOA) in percentage for each condition: (a) chlortoluron alone (green), (b) MPs alone (blue) and (c) cocktail (red), in comparison with the control condition (white). (d) Histograms of VOA (%) for the entire exposure and all conditions. Values are mean ± SEM for control (n = 7), chlortoluron (n = 6), MPs (n = 8) and cocktail (n = 5) conditions. Different letters indicate significant differences between concentrations ($p < 0.05$).

4. Discussion

4.1. Experimental concentrations versus natural environment

In our FSW exposures (chlortoluron and cocktail conditions), concentrations between 58 and 96 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of chlortoluron were measured. Valiente Moro et al. (2012) reported an IC₅₀ (half-maximum inhibitory concentration) of 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ on the freshwater phytoplankton

Ankistrodesmus fusiformis. Although this concentration is higher than those commonly found in the Pertuis Charentais, it is quite close to the maximum concentrations detected in some European rivers. Indeed, concentrations of herbicide (chlortoluron in particular) of 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and more (Beitz et al., 1994) were determined. For herbicide exposure, control FSW highlighted a slight contamination by chlortoluron. Being volatile, it could easily evaporate in the atmosphere and contaminate the other tanks (Ineris, 2013). Nevertheless, the concentrations of

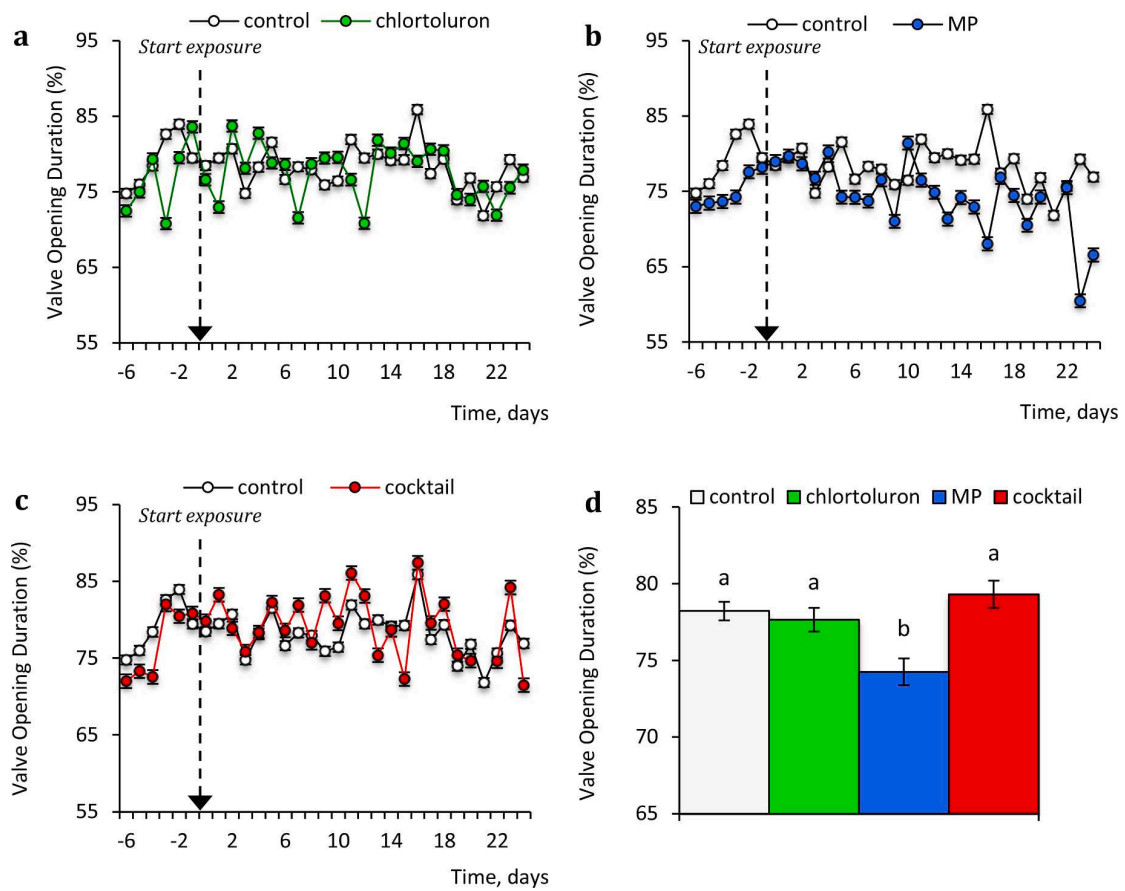


Fig. 3. Valve Opening Duration (VOD) in percentage for each condition: (a) chlortoluron alone (green), (b) MPs alone (blue) and (c) cocktail (red), in comparison with the control condition (white). (d) Histograms of VOA (%) for the entire exposure and all conditions. Values are mean \pm SEM for control (n = 7), chlortoluron (n = 6), MPs (n = 8), and cocktail (n = 5) conditions. Different letters indicate significant differences between concentrations ($p < 0.05$).

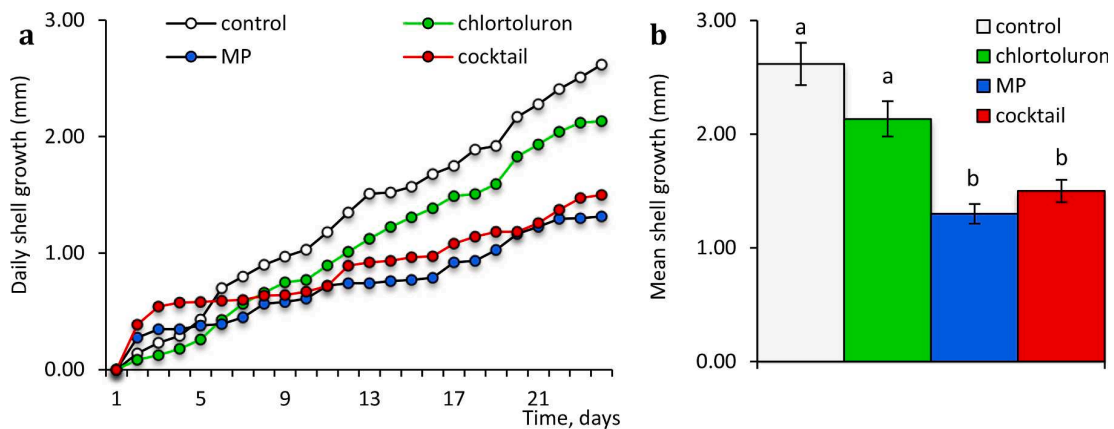


Fig. 4. (a) Daily shell length growth monitored for all conditions (mm). (b) After the completion of the 24-day experiment, histograms displaying the mean shell growth (mm) of the oysters equipped with electrodes. The different conditions are: control (no pollutants, white), chlortoluron alone (green), MPs alone (blue), and cocktail (red). Values are mean \pm SEM for control (n = 7), chlortoluron (n = 6), MPs (n = 8) and cocktail (n = 5) conditions. Different letters indicate significant differences between concentrations ($p < 0.05$).

chlortoluron measured in the control FSW samples were satisfactory to validate the study. An increase of chlortoluron concentrations was observed between the start (D_5) and the end of the experiment (D_{24}). This increase could be explained by the initial presence of chlortoluron in natural seawater ($0.14 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in 2018; Action program, 2018) and

regular water changes during the experiment. In this present study, the theoretical concentration of HDPE MPs (20-25 μm) was set at $10 \mu\text{g MP}\cdot\text{L}^{-1}$. Although high in comparison to environmental concentrations, several studies have used the same concentration of exposure (Beiras et al., 2018; Constant, 2018; Lei et al., 2018 and Dris et al., 2016). To

Table 2

Summary of the effects on the Pacific oyster valve activity induced after a 24-day exposure to chlortoluron alone (85 µg.L⁻¹), 20-25 µm HDPE MPs alone (112 MP.mL⁻¹), and a combination of both (cocktail, 97 µg.L⁻¹ of chlortoluron + 108 MP.mL⁻¹). Measured parameters are VMC (Valve Micro-Closures), VOA (Valve Opening Amplitude), VOD (Valve Opening Duration), daily rhythm (chronobiological analysis), and shell growth (↑: significant increase compared to the control condition, ↓: significant decrease compared to the control condition and - : absence of significant effects compared to the control condition).

Conditions	VMC	VOA	VOD	Daily rhythm	Shell growth
Chlortoluron alone	↓	↑	-	-	-
MPs alone	↑	-	↓	-	↓
Cocktail	↓	↑	-	-	↓

assess MPs/NPs in water, flow cytometry was performed, as used in some studies (Long et al., 2017; Caputo et al., 2021; Kaile et al., 2020). Instead of being 10 µg MP.L⁻¹, the average concentration for solutions containing MPs was approximately 50 µg MP.L⁻¹ at the two sampling periods. The cytometry confirmed contents between 93.9 and 124.4 MP.mL⁻¹ (for MP and cocktail conditions). The highest environmental concentration of MPs detected in Arctic sea ice cores is around 13.7 MP.mL⁻¹ (Peeken et al., 2018). However, the size classes of MPs currently analysed in the natural environment are generally larger than 300 µm and data about MP < 100 µm are still scarce (Doyle et al., 2011; Song et al., 2014; Zhang et al., 2017). Our present study could be defined as realistic in terms of size tested, but not in terms of concentrations. According to a study on the characterisation of MPs on the Atlantic coast, the majority of MPs (64 %) were < 40 µm (Enders et al., 2015). In addition, about half (42 %) of these were PE. These results justify the use of HDPE-MP (20-25 µm) in this study. In addition, some equipment used in aquaculture for bivalves consists mainly of PE (Lusher et al., 2017 and Bringer et al., 2021). The difference observed between the theoretical and measured MP concentrations could come from the aggregation of MPs (Alimi et al., 2018; Michels et al., 2018) on the walls of the exposure tanks. Long et al. (2017) clearly showed that micro-PS bind to glassware, forming homo-aggregates and hetero-aggregates. In addition, regular water changes, for the welfare of oysters, could also have played a role in increasing theoretical concentrations.

4.2. Behavioural responses of juvenile oysters to chlortoluron exposure

Chlortoluron is a photosynthesis-disrupting herbicide, and more specifically is an inhibitor of photosystem II (Faggiano et al., 2010). Phytoplankton communities have been shown to be very sensitive to herbicides (Solomon et al., 1996). Indeed, effects on phytoplankton growth and development have been observed (El-Sheekh et al., 1994), and could indirectly affect filtration of bivalves. Chlortoluron resulted in a significant decrease in VMC frequency compared to the control condition. An equivalent result has already been demonstrated for *Mytilus galloprovincialis* exposed to cypermethrin (insecticide) which reduced the valve closure in a time-dependent manner (Ayad et al., 2011). Higher VOA in the control condition was also detected following exposure to chlortoluron. An apparent increase in the rate of opening of the shell under contamination with a herbicide (lenacil) was reported in an earlier study (Chmist et al., 2019). However, this parameter has not been studied sufficiently to obtain relevant interpretations (Bae and Park, 2014). Chlortoluron may have toxic effects on some distinctive phytoplankton species important for the physiology, development and behaviour of oysters (Stachowski-Haberkorn et al. 2008). Additional studies should be carried out in order to better understand the effect of this herbicide on phytoplankton populations and on oyster nutrition. The combined effects of VMC decrease and VOA increase may suggest that the herbicide leads to an apparent relaxed behaviour in oysters. Other investigations should be carried out to investigate the neurotoxic effects of chlortoluron on oyster valve activity. Indeed, it would be of

interest to study whether chlortoluron may block conduction of action potential at the level of voltage-gated sodium channels. This could play a crucial role in membrane excitability of neurones, and lead to a decrease of neuro-muscular response, as has been shown for many neurotoxins produced by animals or plants, such as saxitoxin and tetrodotoxin (Boulot et al., 2017).

4.3. Behavioural responses of juvenile oysters to microplastics exposure

Oysters exposed to MPs showed a higher number of VMC compared to the other conditions. VMC is defined as a marker of stress in oysters (Tran et al., 2010). The presence of MPs in the seawater, which could be detected by oysters, can induce mechanical stress (Sow et al., 2011). The presence of harmful substances could activate chemoreceptors on the edge of the oyster mantle, or directly affect the gills when the pollutants are in direct contact with the tissue of the pallial cavity, which could result in the rapid increase in the frequency of VMC. According to the work of Castrec et al. (2018), a similar hypothesis could be made, implying that the increase in the frequency of VMC is a protective behavioural response to accelerate pallial cavity water turnover and minimize potential contacts of MPs with gills (Zhu et al., 2020). A significant decrease in VOD was also measured. Likewise, in the freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*) a behavioural closure reaction - as a protective strategy - was observed following exposure to a metallic contaminant (Tran et al., 2004a). The branchial cavities and the labial palps (Ward et al., 1998) determine the different modes of selection and sorting of particles, which could slow down the filtration of nutrients of exposed oysters, affect their feeding activity and behaviour, and reducing their metabolism and growth. Indeed, several studies have noted that toxins and foreign bodies can modify the nutritional activity of oysters through behavioural modifications (Tran et al., 2010; Haberkorn et al., 2010). Oysters exposed to MPs grow more slowly than control oysters. Some previous works have shown non-effects of MPs on oysters during subchronic exposure (Green, 2016; Revel et al., 2020). However, in these latter studies larger sizes of MPs (103 and 300 µm) were tested, in contrast to this present study (20-25 µm). The study by Gardon et al. (2018) showed a decrease in the scope for growth of *P. margaritifera* exposed from 25 µg MP.L⁻¹ of PS particles. These results indicate that the exposed oysters used a fraction of their reserves to fight against MPs contamination. In addition, the assimilation of microalgae was disturbed by the presence of micro-PS, and the energy provided by food intake was lower for exposed oysters (Gardon et al., 2018). In the study conducted by Thomas et al. (2020), the condition index at the highest concentration (106 MP.L⁻¹) decreased significantly over time. The concentration tested in the latter study is similar to our concentrations measured in MP exposure waters.

4.4. Effects of co-contamination by microplastics and chlortoluron on juvenile oysters

For oysters exposed to the cocktail, results were similar to the chlortoluron condition for both VMC and VOA activities. No effect on VOD was noted, in contrast to what was observed for MPs exposure. Chlortoluron and MPs may have antagonistic effects. Zhang et al. (2018) demonstrated antagonistic effects between NPs and glyphosate on the microalgae *Microcystis aeruginosa*. Combined exposure to diclofop-methyl and silver nanoparticles has been shown to antagonise the growth inhibition of *A. Thaliana* (Li et al., 2018). In our study, oyster growth was decreased under the cocktail condition as in the MPs condition. Studies have pointed out that MPs can bind and vectorise hydrophobic organic chemicals (Horton et al., 2018). However, our results do not show significantly different effects for the cocktail compared to MPs, and therefore we cannot conclude a potential vectorization of chlortoluron on MPs. Our results showed that the synergistic effect of chlortoluron and MPs is not significant compared to the contamination conditions alone. Their ecotoxic effects are affected by physical and

chemical factors, such as particle size, shape, colour, composition, and functional group (Yu et al., 2021). Due to their high filtration rate, marine bivalves, such as oysters, are particularly sensitive to chemical contamination, which can be a major source of stress and behavioural alteration (Sokolova and Lannig, 2008; Islam and Tanaka, 2004).

5. Conclusions

On a larger scale, valvometric technology is a sensitive tool for monitoring water quality, using oysters as biosensors (Ahmed et al., 2015). This study provided valuable data on the behaviour of bivalves exposed to pollutants potentially present in the marine environment. Exposure to chlortoluron at 30 µg.L⁻¹ had little impact on their behaviour and none on their growth. In contrast, MPs at 10 µg.L⁻¹ could potentially affect the physiology and behaviour of *C. gigas*. MPs tended to act as stressors in bivalves, triggering urgent behavioural responses. In addition, MPs could affect the filtration capacity of bivalves (nutrient system) and, indirectly, their growth. The combination of both pollutants leads to antagonistic responses in comparison to each pollutant alone. Valvometric technology is an innovative, integrated and comprehensive tool for the monitoring of environmental pollution. Although some investigations are still needed, HFNI valvometry in bivalves may be of use in the future in studying contamination and effects of pollutants including MPs.

CRedit authorship contribution statement

Arno Bringer: Investigation, Methodology, Formal analysis, Visualization, Writing – original draft, Funding acquisition. **Hélène Thomas:** Conceptualization, Methodology, Validation, Writing – review & editing, Funding acquisition, Supervision. **Emmanuel Dubillot:** Methodology. **Stéphane Le Floch:** Investigation, Validation. **Justine Receveur:** Investigation. **Jérôme Cachot:** Conceptualization, Methodology, Validation, Writing – review & editing, Supervision. **Damien Tran:** Methodology, Software, Writing – review & editing, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

A. Bringer received a PhD grant (Comité Régional de la Conchyliculture de la Charente Maritime CRC17) as well as financial support from the Région Nouvelle Aquitaine and Comité Départemental de la Charente Maritime (CD17) to develop his research. The AQUAECOs project (Amélioration de la QUALité Environnementale sur les zones Conchylicoles des Pertuis Charentais), funded by a partnership with CRC17, and the AFB (Agence Française de la Biodiversité, *Parc naturel marin de l’estuaire de la Gironde et de la mer des Pertuis*) contributed financially to this study. The funding was partly supported by the University of La Rochelle, the University of Bordeaux, and the Centre National de la Recherche Scientifique (France). The authors thank the France Naissain hatchery for providing the oyster specimens, as well as our collaborators for their work and help.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.aquatox.2021.105880.

References

- Action program, Coastal water quality in shellfish farming areas, Qualyse, CD17, 2018–2020 (accessed October 2020).
- Ahmed, H., Ushirobira, R., Efimov, D., Tran, D., Massabuau, J.C., 2015. Velocity estimation of valve movement in oysters for water quality surveillance. *IFAC-PapersOnLine* 48 (11), 333–338.
- Akcha, F., Barranger, A., Bachère, E., 2020. Genotoxic and epigenetic effects of diuron in the Pacific oyster: in vitro evidence of interaction between DNA damage and DNA methylation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–15.
- Alimi, O.S., Farmer Budarz, J., Hernandez, L.M., Tufenkji, N., 2018. Microplastics and nanoplastics in aquatic environments: aggregation, deposition, and enhanced contaminant transport. *Environ. Sci. Technol.* 52 (4), 1704–1724.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J., 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international* 86 (2), 412–431.
- Andrade, H., Massabuau, J.C., Cochrane, S., Ciret, P., Tran, D., Sow, M., Camus, L., 2016. High frequency non-invasive (HFNI) bio-sensors as a potential tool for marine monitoring and assessments. *Front. Mar. Sci.* 3, 187.
- Ayad, M.A., Fdil, M.A., Mouabab, A., 2011. Effects of cypermethrin (pyrethroid insecticide) on the valve activity behavior, byssal thread formation, and survival in air of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 60 (3), 462–470.
- Bae, M.J., Park, Y.S., 2014. Biological early warning system based on the responses of aquatic organisms to disturbances: a review. *Sci. Total Environ.* 466, 635–649.
- Baldwin, A.K., Corsi, S.R., Mason, S.A., 2016. Plastic debris in 29 Great Lakes tributaries: relations to watershed attributes and hydrology. *Environ. Sci. Technol.* 50 (19), 10377–10385.
- Baltussen, E., Sandra, P., David, F., Cramers, C., 1999. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations* 11 (10), 737–747.
- Bayne, B.L., Ahrens, M., Allen, S.K., D’auriac, M.A., Bacheljau, T., Beninger, P., Bohn, R., Boudry, P., Davis, J., Green, T., Guo, X., Hedgecock, D., Ibarra, A., Kingsley-Smith, P., Krause, M., Langdon, C., Lapegue, S., Li, C., Manahan, D., Mann, R., Perez-Paralle, L., Powell, E.N., Rawson, P.D., Speiser, D., Sanchez, J.-L., Shumway, S., Wang, H., 2017. The proposed dropping of the genus *Crassostrea* for all Pacific cupped oysters and its replacement by a new genus *Magallana*: a dissenting view. *J. Shellfish Res.* 36 (3), 545e548.
- Bayne, B., d’Auriac, M.A., Bacheljau, T., Beninger, P., Boudry, P., Carnegie, R., Langdon, C., 2019. A scientific name for Pacific oysters. *Aquaculture* 499, 373.
- Behrens, D., Rouxel, J., Burgeot, T., Akcha, F., 2016. Comparative embryotoxicity and genotoxicity of the herbicide diuron and its metabolites in early life stages of *Crassostrea gigas*: implication of reactive oxygen species production. *Aquatic Toxicol.* 175, 249–259.
- Beiras, R., Bellas, J., Cachot, J., Cormier, B., Coussin, X., Engwall, M., Gambardella, C., Garaventa, F., Keiter, S., Le Bihanic, F., Lopez-Ibanez, S., Piazza, V., Rial, D., Tato, T., Vidal-Linan, L., 2018. Ingestion and contact with polyethylene microplastics does not cause acute toxicity on marine zooplankton. *J. Hazard. Mater.* 360, 452–460.
- Beitz, H., Schmidt, H., Herzel, F., 1994. Occurrence, toxicological and ecotoxicological significance of pesticides in groundwater and surface water. *Pesticides in ground and surface water*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–56.
- Berge, J., Daase, M., Renaud, P.E., Ambrose Jr., W.G., Darnis, G., Last, K.S., Leu, E., Coen, J.H., Johnsen, G., Moline, M.A., 2015. Unexpected levels of biological activity during the polar night offer new perspectives on a warming arctic. *Curr. Biol.* 25, 2555–2561.
- Betsill, M., Gonzalez, J., & Woods, A. (2019). The Impact of Microplastic Ingestion on the Bivalve Filtration Efficiency of the Hooked Mussel (*Ischadium recurvum*) from the Chesapeake Bay. Research Proposal for UH 1604: Honors Research Practices at Virginia Tech.
- Bhagat, J., Nishimura, N., Shimada, Y., 2020. Toxicological interactions of microplastics/nanoplastics and environmental contaminants: Current knowledge and future perspectives. *J. Hazard. Mater.*, 123913.
- Bingham, C., Arbogast, B., Cornélissen, G., Lee, J.-K., Halberg, F., 1982. Inferential statistical methods for estimating and comparing cosinor parameters. *Chronobiologia* 9, 397–439.
- Born, M.P., Schüttrumpf, H., 2019. Microplastic in Coastal Areas-Impact of Waves, Sediments and Saltwater on the Degradation Behaviour. In: International Conference on Microplastic Pollution in the Mediterranean Sea (pp. 158–163). Springer, Cham.
- Box, G. E., Jenkins, G. M., Reinsel, G. C., & Ljung, G. M. (2015). *Time series analysis: forecasting and control*. John Wiley & Sons.
- Bringer, A., Thomas, H., Prunier, G., Dubillot, E., Bossut, N., Churlaud, C., Clerandeanu, C., Le Bihanic, F., Cachot, J., 2020a. High density polyethylene (HDPE) microplastics impair development and swimming activity of Pacific oyster D-larvae, *Crassostrea gigas*, depending on particle size. *Environ. Pollut.*, 113978.
- Boulot, F., Castrec, J., Bidault, A., Dantas, N., Payton, L., Perrigault, M., Tran, D., Amzil, Z., Boudry, P., Soudant, P., Hégaret, H., Fabioux, C., 2017. Molecular Characterization of Voltage-Gated Sodium Channels and Their Relations with Paralytic Shellfish Toxin Bioaccumulation in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Drugs* 15 (1), 21.
- Bringer, A., Cachot, J., Prunier, G., Dubillot, E., Clerandeanu, C., Thomas, H., 2020b. Experimental ingestion of fluorescent microplastics by Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, and their effects on the behaviour and development at early stages. *Chemosphere*, 126793.

- Bringer, A., Le Floch, S., Kerstan, A., Thomas, H., 2021. Coastal ecosystem inventory with characterization and identification of plastic contamination and additives from aquaculture materials. *Mar. Pollut. Bull.* 167, 112286.
- Caputo, F., Vogel, R., Savage, J., Vella, G., Law, A., Della Camera, G., Hannon, G., Peacock, B., Mehn, D., Ponti, J., Geiss, O., Aubert, D., Prina-Mello, A., Calzolari, L., 2021. Measuring particle size distribution and mass concentration of nanoplastics and microplastics: addressing some analytical challenges in the sub-micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* 588, 401–417.
- Castrec, J., Soudant, P., Payton, L., Tran, D., Miner, P., Lambert, C., Goïc, N.L., Huvet, A., Quillien, V., Bouillot, F., Amzil, Z., Hégaret, H., Fabioux, C., 2018. Bioactive extracellular compounds produced by the dinoflagellate *Alexandrium minutum* are highly detrimental for oysters. *Aquatic Toxicol.* 199, 188–198.
- Chmist, J., Szoszkiewicz, K., Drożdżyński, D., 2019. Behavioural responses of *Unio tumidus* freshwater mussels to pesticide contamination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 77 (3), 432–442.
- CNC (Comité National de la Conchyliculture), 2016. <http://www.cnc-france.com/La-Production-francaise.aspx> (accessed July 2019).
- CNC (Comité National de la Conchyliculture), 2020; Les statistiques. www.cnc-france.com (accessed October 2020).
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2588–2597.
- Cole, M., Galloway, T.S., 2015. Ingestion of nanoplastics and microplastics by Pacific oyster larvae. *Environ. Sci. Technol.* 49 (24), 14625–14632.
- Constant, M. (2018). Source, Transfert et Devenir des microplastiques (MP) en Mer Méditerranée Nord-Occidentale. *PhD thesis. University of Perpignan-CEPREM*, pp 277.
- Díaz-Mendoza, C., Mouthon-Bello, J., Pérez-Herrera, N.L., Escobar-Díaz, S.M., 2020. Plastics and microplastics, effects on marine coastal areas: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–10.
- Doyle, M.J., Watson, W., Bowlin, N.M., Sheavly, S.B., 2011. Plastic particles in coastal pelagic ecosystems of the Northeast Pacific Ocean. *Mar. Environ. Res.* 71, 41–52.
- Dris, R., Lahens, L., Rocher, V., Gasperi, J., Tassin, B., 2016. Premières investigations sur la contamination en microplastiques d’une zone urbaine. Cas de l’agglomération parisienne 12.
- El-Sheekh, M.M., Ktkat, H.M., Hammouda, O.H., 1994. Effect of atrazine herbicide on growth, photosynthesis, protein synthesis, and fatty acid composition in the unicellular green alga *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 29 (3), 349–358.
- Enders, K., Lenz, R., Stedmon, C.A., Nielsen, T.G., 2015. Abundance, size and polymer composition of marine microplastics $\geq 10 \mu\text{m}$ in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. *Mar. Pollut. Bull.* 100 (1), 70–81.
- Eriksen, M., Maximenko, N., Thiel, M., Cummins, A., Lattin, G., Wilson, S., Hafner, J., Zellers, A., Rifman, S., 2013. Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre. *Mar. Pollut. Bull.* 68 (1–2), 71–76.
- Faggiano, L., de Zwart, D., García-Berthou, E., Lek, S., Gevrey, M., 2010. Patterning ecological risk of pesticide contamination at the river basin scale. *Sci. Total Environ.* 408 (11), 2319–2326.
- France Agrimer, 2020. Chiffres clés des filières pêche et aquaculture en France, en 2020 (accessed February 2021). <https://www.franceagrimer.fr/fam/content/download/64767/document/CC%20pêche%20aqua%20FR.pdf?version=22021>.
- Gall, S.C., Thompson, R.C., 2015. The impact of debris on marine life. *Mar. Pollut. Bull.* 92 (1–2), 170–179.
- Gamaïn, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Clérandeau, C., Mazzella, N., Gourves, P.Y., Morin, B., 2017. Combined effects of temperature and copper and S-metolachlor on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Pollut. Bull.* 115 (1–2), 201–210.
- Gardon, T., Reisser, C., Soyez, C., Quillien, V., Le Moullac, G., 2018. Microplastics affect energy balance and gametogenesis in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Environ. Sci. Technol.* 52 (9), 5277–5286.
- Gardon, T., Morvan, L., Huvet, A., Quillien, V., Soyez, C., Le Moullac, G., Le Luyer, J., 2020. Microplastics induce dose-specific transcriptomic disruptions in energy metabolism and immunity of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Environ. Pollut.* 266, 115180.
- Girard, S., Agúndez, J.A.P., 2014. The effects of the oyster mortality crisis on the economics of the shellfish farming sector: Preliminary review and prospects from a case study in Marennes-Oleron Bay (France). *Mar. Policy* 48, 142–151.
- Gouthiere, L., Mauvieux, B., Davenne, D., Waterhouse, J., 2005. Complementary methodology in the analysis of rhythmic data, using examples from a complex situation, the rhythmicity of temperature in night shift workers. *Biol. Rhythm Res.* 36 (3), 177–193.
- Green, D.S., 2016. Effects of microplastics on European flat oysters, *Ostrea edulis* and their associated benthic communities. *Environ. Pollut.* 216, 95–103.
- Haberhorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Moal, J., Suquet, M., Guéguen, M., Sunila, I., Soudant, P., 2010. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae* 9 (5), 427–439.
- Haberhorn, H., Tran, D., Massabuau, J.C., Ciret, P., Savar, V., Soudant, P., 2011. Relationship between valve activity, microalgae concentration in the water and toxin accumulation in the digestive gland of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to *Alexandrium minutum*. *Mar. Pollut. Bull.* 62 (6), 1191–1197.
- Horton, A.A., Svendsen, C., Williams, R.J., Spurgeon, D.J., Lahive, E., 2017. Large microplastic particles in sediments of tributaries of the River Thames, UK—Abundance, sources and methods for effective quantification. *Mar. Pollut. Bull.* 114 (1), 218–226.
- Horton, A.A., Vijver, M.G., Lahive, E., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Heutink, R., van Bodegom, P.M., Baas, J., 2018. Acute toxicity of organic pesticides to *Daphnia magna* is unchanged by co-exposure to polystyrene microplastics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 166, 26–34.
- Ineris. (2013). Valeur guide environnementale: Chlortoluron (15545-48-9). <https://substances.ineris.fr/fr/substance/cas/15545-48-9/3>.
- Islam, M.S., Tanaka, M., 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 48 (7–8), 624–649.
- Kaile, N., Lindivat, M., Elio, J., Thuestad, G., Crowley, Q.G., Hoell, I.A., 2020. Preliminary results from detection of microplastics in liquid samples using flow cytometry. *Front. Mar. Sci.* 7, 856.
- Lee, K.W., Shim, W.J., Kwon, O.Y., Kang, J.H., 2013. Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Environ. Sci. Technol.* 47 (19), 11278–11283.
- Lee, D.H., Rhee, Y.J., Choi, K.S., Nam, S.E., Eom, H.J., Rhee, J.S., 2017. Sublethal concentrations of atrazine promote molecular and biochemical changes in the digestive gland of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Toxicol. Environ. Health Sci.* 9 (1), 50–58.
- Lehotay, S.J., 2007. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *J. AOAC Int.* 90, 485–520.
- ... & Lei, L., Wu, S., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Fu, Z., He, D., 2018. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Sci. Total Environ.* 619, 1–8.
- Leonard, S. Dispersion des pesticides vers les eaux - Bassin de la Sèvre Niortaise et Marais Poitevin Période 2004-2014, 2017. http://www.sevre-niortaise.fr/wp-content/uploads/2017/04/etude_pesticides_SAGE_SNMP_31032017.pdf (accessed January 2020).
- Li, X., Ke, M., Zhang, M., Peijnenburg, W.J.G.M., Fan, X., Xu, J., Zhang, Z., Lu, T., Fu, Z., Qian, H., 2018. The interactive effects of diclofop-methyl and silver nanoparticles on *Arabidopsis thaliana*: growth, photosynthesis and antioxidant system. *Environ. Pollut.* 232, 212–219.
- Long, M., Paul-Pont, I., Hégaret, H., Moriceau, B., Lambert, C., Huvet, A., Soudant, P., 2017. Interactions between polystyrene microplastics and marine phytoplankton lead to species-specific hetero-aggregation. *Environ. Pollut.* 228, 454–463.
- Lucasson, A. (2018). Characterization and diversity of the mechanisms of the mortality syndrome affecting juveniles of *Crassostrea gigas*. *PhD thesis. University of Montpellier*, pp 165.
- Lusher, A., Hollman, P., & Mendoza-Hill, J. (2017). Microplastics in fisheries and aquaculture. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper (FAO) eng no. 615*.
- 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.
- Mat, A.M., Massabuau, J.C., Ciret, P., Tran, D., 2014. Looking for the clock mechanism responsible for the circatidal behavior in the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 161, 89–99.
- Michels, J., Stippkugel, A., Lenz, M., Wirtz, K., Engel, A., 2018. Rapid aggregation of biofilm-covered microplastics with marine biogenic particles. *Proc. R. Soc. B* 285 (1885), 20181203.
- 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*. *Aquatic Toxicol.* 128, 67–78.
- Nelson, W., Tong, Y.L., Lee, J.K., Halberg, F., 1979. Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia* 6, 305–323.
- Paul-Pont, I., Tallec, K., Gonzalez-Fernandez, C., Lambert, C., Vincent, D., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J.L., Brotons, G., Lagarde, F., Fabioux, C., Soudant, P., Huvet, A., 2018. Constraints and priorities for conducting experimental exposures of marine organisms to microplastics. *Front. Mar. Sci.* 5, 252.
- Peeken, I., Primpke, S., Beyer, B., Gütermann, J., Katlein, C., Krumpfen, T., Bergmann, M., Hehemann, L., Gerdt, G., 2018. Arctic sea ice is an important temporal sink and means of transport for microplastic. *Nat. Commun.* 9 (1), 1–12.
- Pfannkuch, E. A., Stuff, J. R., Whitecavage, J. A., & Moran, J. H. (2010). High Throughput Method for the Determination of PAHs in Seafood by QuEChERS-SBSE-GC-MS.
- Phuong, N.N., 2018. Analytical developments for the characterization and quantification of microplastic contamination of sedimentary and biological matrices: application to shellfish farming areas in Pays de la Loire. *PhD thesis. University of Nantes*.
- PlasticsEurope (2016) Plastics – the Facts 2016. An analysis of European plastics production, demand and waste data. URL <http://www.plasticseurope.de/Document/plastics—the-facts-2016-15787.aspx>.
- PlasticsEurope. (2020). Plastics - the facts 2020: an analysis of European plastics production, demand and waste data. *PlasticsEurope Internal Report 4312 (64pp)*. <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/4312-plastics-facts-2020>.
- Revel, M., Châtel, A., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Akcha, F., Sussarellu, R., Rouxel, J., Costil, K., Decottignies, P., Cognie, B., Lagarde, F., Mouneyrac, C., 2020. Realistic environmental exposure to microplastics does not induce biological effects in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Pollut. Bull.* 150, 110627.
- Rist, S., Baun, A., Almeda, R., Hartmann, N.B., 2019. Ingestion and effects of micro-and nanoplastics in blue mussel (*Mytilus edulis*) larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 140, 423–430.
- Scargle, J.D., 1982. Studies in astronomical time series analysis. II-Statistical aspects of spectral analysis of unevenly spaced data. *Astrophys. J.* 263, 835–853.
- Schwartzmann, C., Durrieu, G., Sow, M., Ciret, P., Lazareth, C.E., Massabuau, J.-C., 2011. *In situ* giant clam growth rate behavior in relation to temperature: a one-year coupled study of high-frequency noninvasive valvometry and sclerochronology. *Limnol. Oceanogr.* 56, 1940–1951.

- Sokolova, I.M., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Res.* 37 (2–3), 181–201.
- Soletchnik, P., Bouquet, A. L., & Mille, D. (2018). Flash Info Maline 2008-2018, ten years already... of communication on the mortalities of oysters (*Crassostrea gigas*) and mussels (*Mytilus edulis*) in the Pertuis Charentais. *Ifremer report*, pp 18.
- Solomon, K.R., Baker, D.B., Richards, R.P., Dixon, D.R., Klaine, S.J., LaPoint, T.W., 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15 (1), 31–74.
- Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, M., Han, G.M., Shim, W.J., 2014. Occurrence and distribution of microplastics in the sea surface microlayer in Jinhae Bay, South Korea. *Arch. Environ. Con. Tox.* 69, 279–287.
- Song, Y.K., Hong, S.H., Jang, M., Han, G.M., Shim, W.J., 2015. Occurrence and distribution of microplastics in the sea surface microlayer in Jinhae Bay, South Korea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 69 (3), 279–287.
- Sow, M., Durrieu, G., Briollais, L., Ciret, P., Massabuau, J.C., 2011. Water quality assessment by means of HFNI valvometry and high-frequency data modeling. *Environ. Monit. Assess.* 182 (1–4), 155–170.
- Stachowski-Haberkorn, S., Quiniou, F., Nedelec, M., Robert, R., Limon, G., de La Broise, D., 2008. In-situ microcosms, a tool for assessment of pesticide impacts on oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Ecotoxicology* 17 (4), 235–245.
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M.E.J., Goic, N. L., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Charlotte, C., Julien, G., Johan, R., Ika, P.-P., Philippe, S., Arnaud, H., 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 2430–2435.
- Tallec, K., Huvet, A., Di Poi, C., González-Fernández, C., Lambert, C., Petton, B., Le Goic, N., Berchel, M., Soudant, P., Paul-Pont, I., 2018. Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos. *Environ. Pollut.* 242, 1226–1235.
- Thomas, M., Jon, B., Craig, S., Edward, R., Ruth, H., John, B., Dick, V.A., Heather, L.A., Matthew, S., 2020. The world is your oyster: low-dose, long-term microplastic exposure of juvenile oysters. *Heliyon* 6 (1), e03103.
- Tran, D., Fournier, E., Durrieu, G., Massabuau, J.-C., 2004a. Copper detection in the asiatic clam *Corbicula fluminea*: optimum valve closure response. *Aquatic. Toxicol.* 66 (3), 333–343.
- Tran, D., Massabuau, J.-C., Garnier-Laplace, J., 2004b. The effect of carbon dioxide on uranium bioaccumulation in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (3), 739–747.
- Tran, D., Bourdineaud, J.-P., Massabuau, J.-C., Garnier-Laplace, J., 2005. Modulation of uranium bioaccumulation by hypoxia in the freshwater clam *Corbicula fluminea*: induction of multixenobiotic resistance protein and heat shock protein 60 in gill tissues. *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (9), 2278–2284.
- Tran, D., Fournier, E., Durrieu, G., Massabuau, J.-C., 2007. *Corbicula fluminea* valve closure response as sensitivity threshold to inorganic mercury contamination. *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (7), 1545–1551.
- Tran, D., Haberkorn, H., Soudant, P., Ciret, P., Massabuau, J.C., 2010. Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture* 298 (3–4), 338–345.
- Tran, D., Ciutat, A., Mat, A., Massabuau, J.C., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goic, N., 2015. The toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* disrupts daily rhythmic activities at gene transcription, physiological and behavioral levels in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic. Toxicol.* 158, 41–49.
- Valiente Moro, C., Bricheux, G., Portelli, C., Bohatier, J., 2012. Comparative effects of the herbicides chlortoluron and mesotrione on freshwater microalgae. *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (4), 778–786.
- Wagner, M., Scherer, C., Alvarez-Munoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., Fries, E., Grosbois, C., Klasmeier, J., Marti, T., Rodriguez-Mozaz, S., Urbatzka, R., Vethaak, A., Winther-Nielsen, M., Reifferscheid, G., 2014. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environ. Sci. Eur.* 26 (1), 12.
- Wang, F., Gao, J., Zhai, W., Liu, D., Zhou, Z., Wang, P., 2020. The influence of polyethylene microplastics on pesticide residue and degradation in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 394, 122517.
- Ward, J.E., Levinton, J., Shumway, S., Cucci, T., 1998. Particle sorting in bivalves: *in vivo* determination of the pallial organs of selection. *Mar. Biol.* 131 (2), 283–292.
- Ward, J.E., Zhao, S., Holohan, B.A., Mladinich, K.M., Griffin, T.W., Wozniak, J., Shumway, S.E., 2019. Selective Ingestion and Egestion of Plastic Particles by the Blue Mussel (*Mytilus edulis*) and Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*): Implications for Using Bivalves as Bioindicators of Microplastic Pollution. *Environ. Sci. Technol.* 53 (15), 8776–8784.
- Wright, S.L., Rowe, D., Thompson, R.C., Galloway, T.S., 2013. Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Curr. Biol.* 23 (23), R1031–R1033.
- Xu, X.Y., Lee, W.T., Chan, A.K.Y., Lo, H.S., Shin, P.K.S., Cheung, S.G., 2017. Microplastic ingestion reduces energy intake in the clam *Atacodea striata*. *Mar. Pollut. Bull.* 124 (2), 798–802.
- Yu, H., Peng, J., Cao, X., Wang, Y., Zhang, Z., Xu, Y., Qi, W., 2021. Effects of microplastics and glyphosate on growth rate, morphological plasticity, photosynthesis, and oxidative stress in the aquatic species *Salvinia cucullata*. *Environ. Pollut.* 279, 116900.
- Zhang, W., Zhang, S., Wang, J., Wang, Y., Mu, J., Wang, P., et al., 2017. Microplastic pollution in the surface waters of the Bohai Sea, China. *Environ. Pollut.* 231, 541–548.
- Zhang, Q., Qu, Q., Lu, T., Ke, M., Zhu, Y., Zhang, M., Zhang, Z., Du, B., Pan, X., Sun, L., Qian, H., 2018. The combined toxicity effect of nanoplastics and glyphosate on *Microcystis aeruginosa* growth. *Environ. Pollut.* 243, 1106–1112.
- Zhao, S., Zhu, L., Wang, T., Li, D., 2014. Suspended microplastics in the surface water of the Yangtze Estuary System, China: first observations on occurrence, distribution. *Mar. Pollut. Bull.* 86 (1–2), 562–568.
- Zhu, X., Qiang, L., Shi, H., Cheng, J., 2020. Bioaccumulation of microplastics and its *in vivo* interactions with trace metals in edible oysters. *Mar. Pollut. Bull.* 154, 111079.

RÉSULTATS MAJEURS

- ⇒ La condition MP de HDPE seuls a montré un effet significatif important sur la fréquence des micro-fermetures à partir du 6^{ème} jour d’exposition chez les naissains d’huître creuse.
- ⇒ L’amplitude d’ouverture valvaire s’est révélée plus forte pour les conditions d’exposition aux Chlortoluron seul et mélange de contaminants chimiques (MP et Chlortoluron). *A contrario* la durée d’ouverture valvaire a été diminuée pour la condition MP de HDPE seuls.
- ⇒ La croissance a été retardée pour les conditions MP de HDPE seuls et mélange de contaminants chimiques (MP et Chlortoluron).
- ⇒ Aucun effet n’a été observé sur les rythmes biologiques des naissains d’huîtres exposées.
- ⇒ Hypothèse : à une concentration représentative du milieu environnemental, les MP de HDPE commerciaux sembleraient déclencher un signal d’alarme chez les naissains huîtres avec l’augmentation de la fréquence des microfermetures. Des analyses complémentaires devraient permettre de mieux comprendre le mode d’action des MP sur le comportement valvaire.

B. Article 7 : Effets intergénérationnels des microplastiques aquacoles vieillis dans l’environnement, à divers stades de vie (survie/fécondation au stade adulte et génération larvaire) chez l’huître creuse (*C. gigas*)

Les résultats des précédentes études présentées dans ce manuscrit, semblent montrer que les stades précoces de développement sont les plus sensibles aux pollutions chimiques et perturbations environnementales. Il nous est apparu intéressant d’étudier la réponse au stress des huîtres creuses au stade adulte dans leur période de gamétogénèse et maturation, ainsi que la toxicité potentielle sur la génération F1 larvaire. Cette expérimentation a concerné une exposition subchronique longue de deux mois sur des huîtres creuses adultes matures, issue d’écloserie (France Naissain). Les MP environnementaux d’origine ostréicole (mélange de PE, PP et PVC) ont été testés à trois concentrations : 0 ; 0,1 et 10 mg MP.L⁻¹. Durant ces deux mois d’exposition, un suivi de la survie et de la croissance, une analyse de biomarqueurs d’effet (stress oxydatif, détoxification, peroxydation lipidique et défense), une quantification des MP présents dans les tissus et les biodépôts ont été effectués. A la fin des deux mois d’exposition, une fécondation *in vitro* a été réalisée afin de produire des embryons à partir des parents préalablement exposés. Par la suite, les larves-D ont été analysées à 24, 48 et 72 h de développement. Les observations ont porté sur l’étude du comportement natatoire (vitesse de nage, trajectoires de nage), le développement (malformations et arrêt de développement) ainsi que la croissance larvaire.

Les premiers résultats ont montré une mortalité plus élevée chez les individus exposés aux MP (dose-réponse dépendante de la concentration). Aucun effet sur la croissance et indice de condition n’a été observé. Par ailleurs, une réponse de l’enzyme Laccase (Luna-Acosta *et al.*, 2010), a été observée via l’augmentation de l’activité spécifique de cette enzyme dans la glande digestive des huîtres creuses adultes exposées. La Laccase est une enzyme soupçonnée d’intervenir dans les mécanismes de défense de l’huître creuse, et dans ces conditions ces résultats suggèrent une possible modulation de la réponse immunitaire des bivalves testés (Gagnaire *et al.*, 2007 ; Breitwieser *et al.*, 2016 ; Luna-Acosta *et al.*, 2017). La présence de MP dans les tissus et dans les biodépôts des animaux testés indique une dynamique ingestion/excrétion des MP susceptible d’influencer la gamétogénèse, et les embryons nouvellement formés. Enfin, l’étude portant sur la phase larvaire, a permis de montrer des effets significatifs sur le comportement natatoire, le développement et la croissance de larves-D issues de parents préalablement exposés dans les conditions d’expérience précitées.

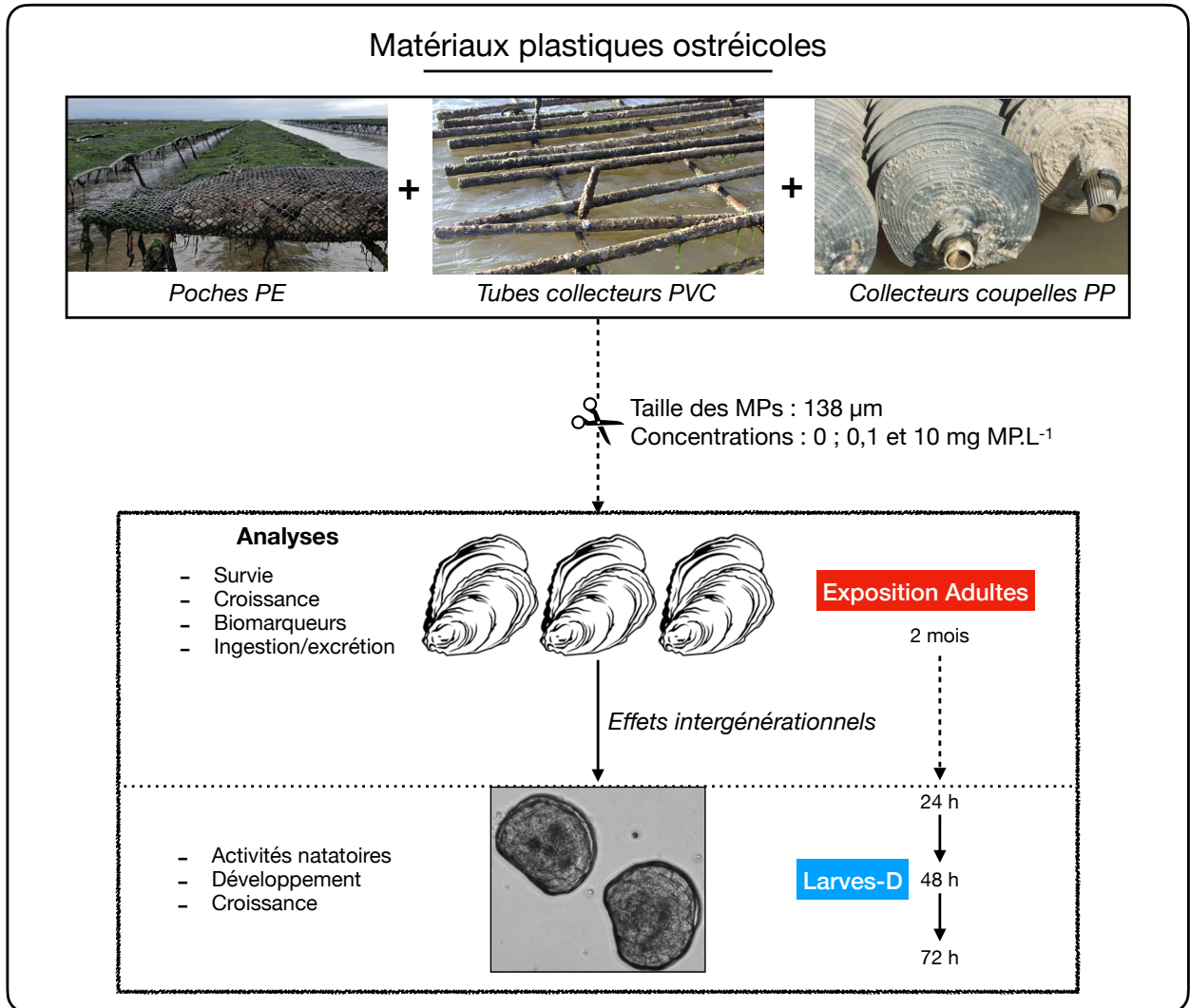


Figure 42. Schéma résumant les travaux réalisés dans le cadre de l’Article 7.

Intergenerational effects of environmentally-aged microplastics on the *C. gigas* larval behaviour, development and growth

Arno Bringer¹⁺, Jérôme Cachot², Emmanuel Dubillot¹, Grégoire Prunier¹, Valérie Huet¹, Christelle Clérandeau², Louise Evin¹, Hélène Thomas¹⁺

¹ Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266, CNRS-Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, F-17042 La Rochelle Cedex 01, France.

² Université de Bordeaux, CNRS, EPOC, EPHE, UMR 5805, F-33600 Pessac, France.

⁺Corresponding author: email: arno.bringer1@univ-lr.fr

Abstract

This study focused on the impacts of aged aquaculture microplastics (MPs) on oysters (*Crassostrea gigas*). Adult oysters were exposed for two months to a cocktail of MPs representative of the contamination of the Pertuis Charentais area (Bay of Biscay, France) and issuing from oyster framing material. The MPs mixture included 28 % of polyethylene, 40 % of polypropylene and 32 % of PVC. During the exposure, tissues were sampled for various analyzes (MP quantification, toxicity biomarkers). Although no effect on the growth of adult oysters was noted, the mortality rate of bivalves exposed to MPs (0.1 and 10 mg MP. L⁻¹) increased significantly (respectively 13.3 and 23.3 % of mortalities cumulative). On the one hand, the responses of biomarkers revealed impacts on oxidative stress, lipid peroxidation and environmental stress. At 56 days of exposure, significant increases were noted for GST (10 mg MP. L⁻¹), MDA (10 mg MP. L⁻¹) and LAC (0.1 and 10 mg MP. L⁻¹). No variations were observed for SOD. Besides, ingestion of MPs in oyster tissues and the presence in biodeposits was highlighted. In addition, *in vitro* fertilisations were performed to characterize MPs effects on the offspring. Swimming behavior, development and growth of D-larvae were analyzed at 24-, 48- and 72-hours after fertilisation. D-larvae, from exposed parents, demonstrated reduced locomotor activity. Developmental abnormalities and arrest as well as growth retardation were also noted. This study highlighted direct and intergenerational effects of MPs from aged plastic materials on Pacific oysters.

Keywords Oyster, microplastics, reproduction, larval behaviour, development and growth, intergenerational effects, *Crassostrea gigas*

1. Introduction

The growing use of plastics dramatically increases their production in Europe (57.9 million tons, PlasticsEurope, 2020) and in the World (368 million tons). Whether from land, atmosphere or rivers, anthropogenic pollutants, including plastics, end up in the marine environment (Halpern *et al.*, 2008). The study carried out by Lebreton *et al.* (2017) estimates that between 1.15 and 2.41 million tonnes of plastic waste currently enter the ocean each year from rivers and streams, with 67 % of inputs linked to major Asian rivers. In recent years, microplastics (MPs) has drawn the public’s attention. MPs are defined as plastic particles between 1 µm and 5 mm (Cole *et al.*, 2011; Wagner *et al.*, 2014), while nanoplastics (NPs) are smaller than 100 nm (Lambert and Wagner, 2016; Gigault *et al.*, 2016). MPs are spread in all oceans (Barnes *et al.*, 2009), including in the Arctic Ocean (Zarfl & Matthies, 2010). The MP size range distribution in the environment depends on hydrodynamic conditions, and degradation processes (Enders *et al.*, 2015). MPs occurrence in ocean is variable over time and space.

Oceanic gyres and coastal areas as hot spots of MP accumulation (Law *et al.*, 2010). In Europe, 73 % of the plastic production resorts to 6 polymers (PlasticsEurope, 2020): polypropylene (PP), high and low-density polyethylene (HDPE and LDPE), polyvinyl chloride (PVC), polyurethane (PUR), polyethylene terephthalate (PET) and polystyrene (PS). Once ingested, MPs cause abrasions, obstructions and alterations of physiological structures, affecting the survival of individuals (Wright *et al.*, 2013). MPs can also generate chemical damage, as they contained a large variety of additives (Pérez-Albaladejo *et al.*, 2020; Hermabessiere *et al.*, 2017) and can sorbed persistent organic pollutants and heavy metals (Rochman 2013; Bakir *et al.*, 2014; Gorman *et al.*, 2019; Naik *et al.*, 2019). Recent studies have documented the potential effects of MPs on marine organisms and in particular bivalves (Tallec *et al.*, 2018; Sussarellu *et al.*, 2016; Revel *et al.*, 2020). However, most of the MPs studied were of commercial origin and very few studies focused on the impacts of environmental MPs (Pannetier *et al.*, 2020; Cormier *et al.*, 2021; Gardon *et al.*, 2020).

Bivalves are commonly used in studies to assess water quality and habitat. These filter feeders, in particular *Crassostrea gigas* oysters, are sensitive to alterations in water quality, which makes them good bioindicators and bioaccumulators for the study of pollutants (O'Connor, 2002), and in particular of MPs (Ward *et al.*, 2019; Bonanno & Orlando-Bonaca, 2018). In fact, oysters (*C. gigas*) are considered sentinel species of anthropized coastal ecosystems, due to their wide distribution, their sedentary lifestyle, and their sensitivity to a large range of pollutants (Conger *et al.*, 1978; His *et al.*, 1999; Quiniou *et al.*, 2007). Found in the bivalve tissues, MPs appear as fibres, fragments or granules (Cho *et al.*, 2019; Jin-Feng *et al.*, 2018). MP size and shape vary according to the tissue and species (Li *et al.*, 2015). Phuong *et al.* (2018) highlighted that MP contamination fluctuated according to seasons, species and their living conditions (wild or farmed). Several previous studies have shown the presence of MPs in the tissues of oysters living on the French Atlantic coasts (Van Cauwenbergh and Janssen, 2014; Phuong *et al.*, 2018). Sussarellu *et al.* (2016) demonstrated that the PS-MPs ingestion altered energy flows, metabolism and homeostasis in oysters, resulting in a loss of energy dedicated to their reproductive function. They also noted impacts on the gametogenesis, with a decrease in quantity and quality of the gametes produced. Several studies underlined MPs effects on adult bivalves – including on their gametogenesis mechanism, and early larval stages. Cole & Galloway (2015) demonstrated that oyster larvae ingested PS-MPs, although their study differed in terms of larval stages and particle sizes. Tallec *et al.* (2018) reported a significant increase in malformation and developmental arrest (early mortality) frequencies in oyster larvae exposed to PS-NPs. Bringer *et al.* (2020b) studied the ingestion and effects of fluorescent MPs (mixed polymers) on oyster larvae. They documented that 72h-old D-larvae ingested MPs, which were detected in their digestive tract. This study also highlighted that MPs are able to stick to the locomotor cilia of D-larvae, influencing their swimming behaviour at 24-h of development. In addition, Bringer *et al.* (2020a) demonstrated that an exposure to 4-13 µm HDPE-MPs, affected the oyster maximum swimming speed and trajectories of oyster larvae. A recent study focused on effects environmental MPs on the early stages of the pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Gardon *et al.*, 2020). This work documented the impacts of aged plastics on the embryo-larval and larval stages, leading to malformations and mortalities depending on the tested concentrations (Gardon *et al.*, 2020).

Aquaculture professionals regularly use plastic tools (Lusher *et al.*, 2017). Following extreme hydroclimatic events (storms, winds or strong currents, etc.), professional materials become detached and drift towards beaches and coasts during high tides. Plastics, used in French oyster farming, could deteriorate, fragment and become toxic when broken down into particles of MPs/NPs. MPs could have harmful effects on different development cycles in oysters (reproduction, fixation, growth). The French shellfish market is important. Each year, nearly 130,000 tonnes of oysters (*C. gigas*) are

produced and marketed, while the activity generates more than 20,000 jobs (CNC, 2020). The sustainability of shellfish companies depends on the quality of the water.

This study aimed at assessing effects of environmentally-aged MPs (from shellfish farming) on adult oysters (*C. gigas*) and their offspring. The MPs used ($138.6 \pm 2.3 \mu\text{m}$) were a cocktail of three different aged-polymers: oyster crops (HDPE), collector cups (PP) and collector tubes (PVC). The data obtained included: (i) MP exposure of two-month-old adult oysters, with a follow-up on survival, biometrics, potential ingestion/excretion (tissues/biodeposits) and biomarker responses; (ii) larvae from exposed parents, with a 72-hour follow-up on swimming behaviour, development (malformations and developmental arrest) and length growth.

2. Materials and Method

2.1 Preparation and analysis of environmentally-aged cocktail of MPs

Plastic macrodebris were recovered on the French Atlantic beach (South-West, France), more precisely in the Angoulins-sur-Mer municipality (Bringer *et al.*, 2021b). These were sorted to identify plastics from the oyster farming industry. HDPE oyster culture crops, PP cup collectors and PVC tube collectors, were selected. A GC-MS pyrolysis analysis ($700 \text{ }^\circ\text{C}$) of the three plastic materials selected (manual cutting of 130-200 μg samples) allowed the identification of the main polymer. After a rough cut (3-4 cm), the plastics were crushed using a stationary metal hammer, crushing the plastics several times. Then, the plastics were sieved using 5 mm, 1 mm and 100 μm sieves. The grinding was carried out at room temperature so as not to influence the nature of the polymers materials. MPs cocktail of $138.6 \pm 2.3 \mu\text{m}$ were recovered (three analytical replicates in laser granulometry, Malverne). MPs cocktail was composed of 28 % HDPE, 40 % PP and 32 % PVC. The proportions of MPs present in this cocktail refer to the main polymers found in the marine environment according to the study by Andrady, 2011. Each solution was prepared in pure Milli-Q-water (Millipore) and kept in the dark at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figure 1). To carry out a quantitative analysis of MPs in experimental seawater, each cocktail solution (0.1, and 10 mg MP. L^{-1}) was tested through a flow cytometer (Attune Acoustic Focusing Cytometer) according to the protocole described previously (Bringer *et al.*, 2020a ; Bringer *et al.*, 2020b). Two-millilitre samples from each MP exposition solution were vortexed (StarLab Vortex IR, 12,000 rpm for 20 sec) to homogenise the solutions and then 300 μL were taken for flow cytometry analysis. A calibration was carried out, thanks to previous studies (Bringer *et al.*, 2020a) with commercial MPs, to achieve an analysis rate of $500 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ and a saturation of 10,000 particles maximum detected. From the control conditions (10 μm filtered seawater), control analytical samples ($n=12$) were created. The blank obtained enabled to remove background particles (natural present in seawater). Using seawater filtered at 0.2 μm , a first calibration was conducted to select the < 200 -time detected particles. MPs measurements in seawater were assessed at T_1 (D_{17}), T_2 (D_{35}) and T_3 (D_{56}) for all exposure conditions.

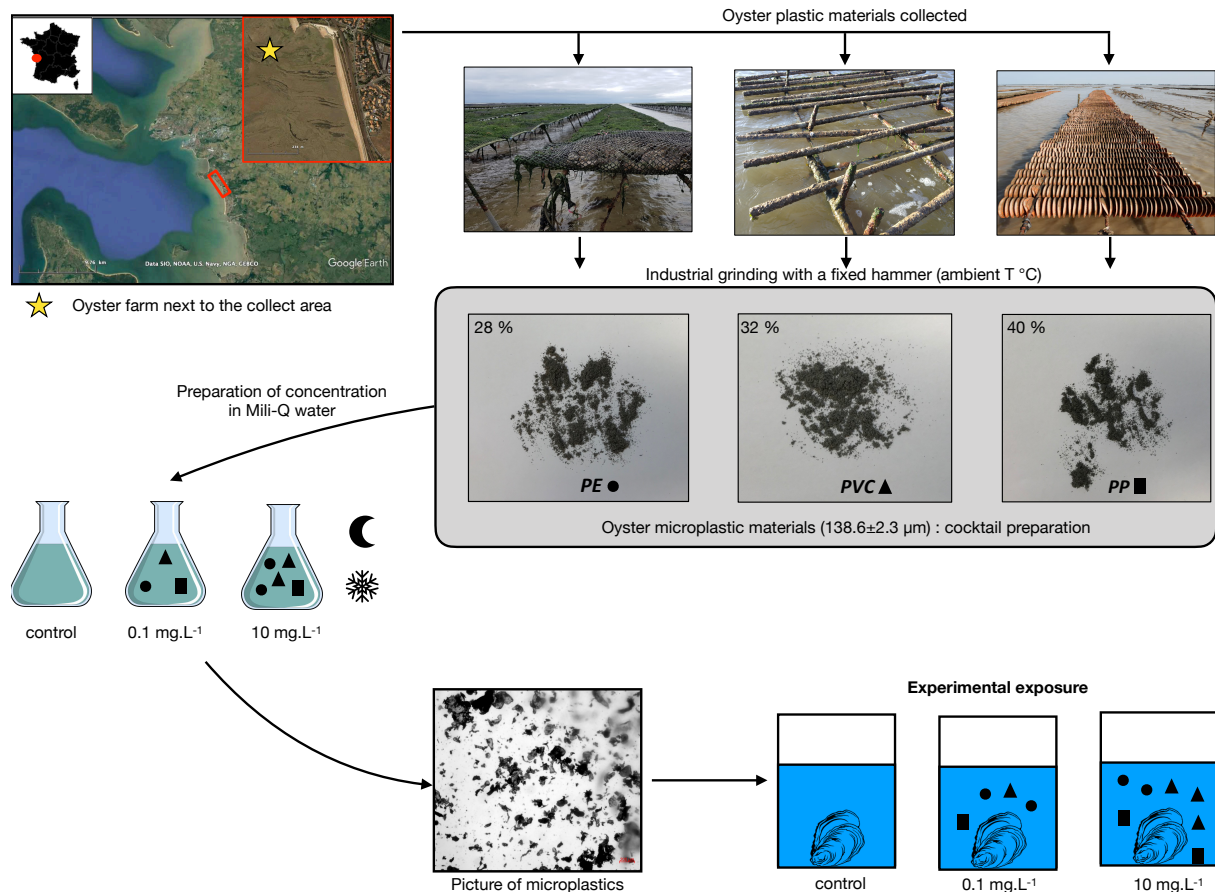


Figure 1. Experimental design of adult oysters exposed to MPs cocktail obtained from different aged-plastic materials used in French oyster farms.

2.2 Experimental exposure of adult oysters and larvae

In June 2019, adult oysters *Crassostrea gigas* (Bayne *et al.*, 2019; Bayne *et al.*, 2017) purchased from a commercial hatchery (24 mo, 15.75 ± 1.5 g) were transferred to our laboratory. After a 7-day acclimatisation period, the oysters were placed in 9 experimental tanks of 37.5 L (n=30 oysters per tank, with three replicates tanks per condition) with 3 large buffer tanks (one buffer tank per condition). Tanks were supplied with filtered (10 μm) UV-treated (78.3 L.h^{-1}) running seawater (filtered seawater, FSW) at a temperature of 18.5 ± 0.1 °C, salinity of 35.3 ± 0.06 and natural photoperiod. During the experiment, the tank temperature was gradually increased to faithfully recreate the environmental conditions of spring on the French Atlantic coast (Zapata-Restrepo *et al.*, 2019). Seawater came from the Atlantic Ocean (South-West, France) in the Pertuis Breton and more precisely it was pumped in the Baie de l'Aiguillon (La Rochelle, France). Once a day, oysters were fed with a mixed diet (*T.Isochrysis galbana*, *Pavlova*, *Tetraselmis*, *Thalassiosira* and *Nanno*, Shelfish diet, VariconAqua). Tanks (n=3/condition) containing the exposed oysters, were connected to a buffer tank, equipped with an air bubbling system in order to aerate FSW, and carry out a continuous water renewal in a closed system. The buffer tanks had the same physicochemical parameters as the exposure tanks. Every two days, water was renewed to prevent bacterial growth and provide good conditions for oysters. Three conditions were set up: control condition (without MPs), $0.1 \text{ mg MP. L}^{-1}$, and 10 mg MP. L^{-1} (Figure 2). In each buffer tank, a pumping system was set up to homogenise MPs in water. After a two-month exposure, oysters were mating to obtain embryos. Then, oyster larvae were grown in filtered seawater (0.2 μm) at 24 °C (optimal temperature for development, Robinson,

1992) and potential effects of MPs on their swimming behaviour and development were recorded at 24-, 48- and 72-hours (Figure 2).

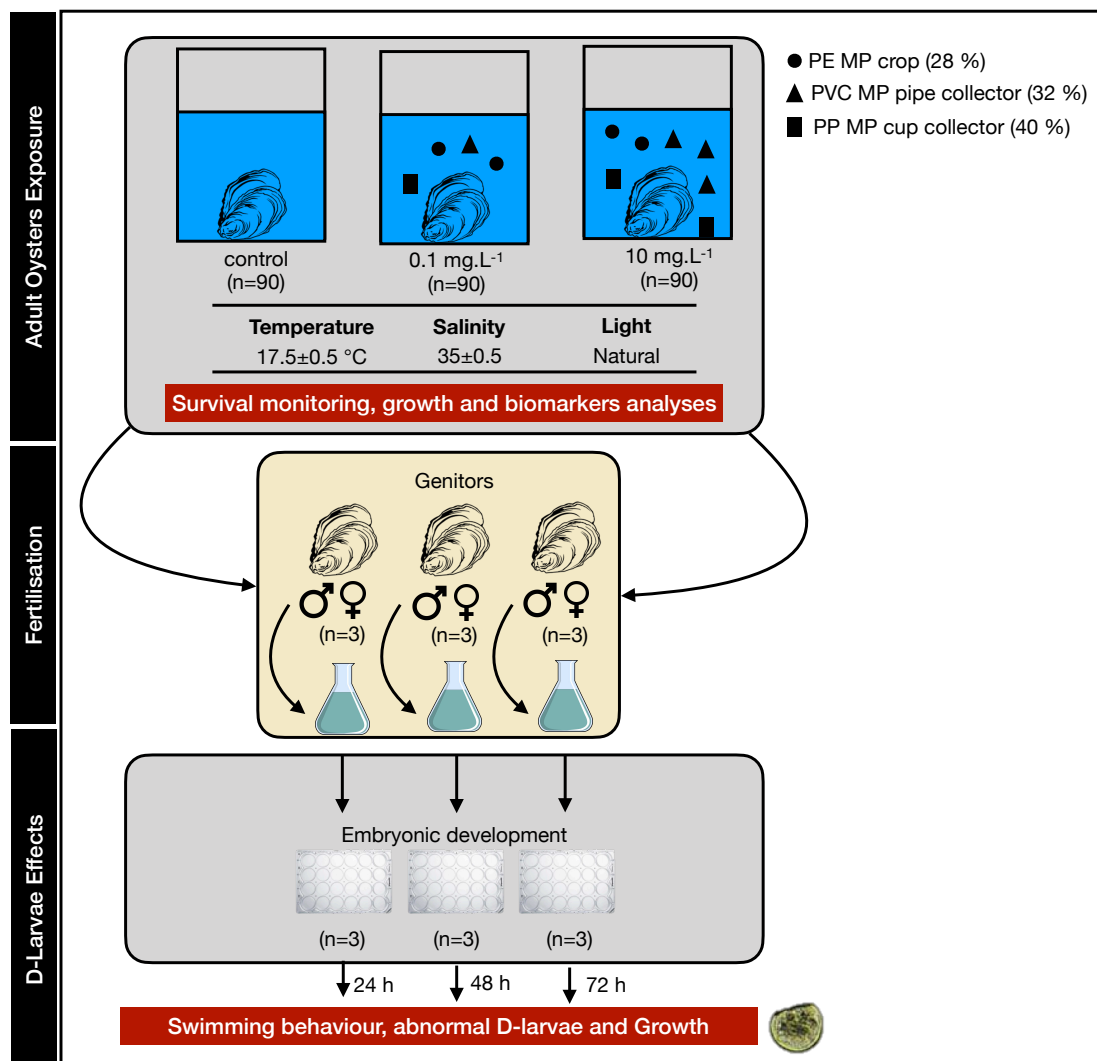


Figure 2. Experimental design of adult oysters exposed to environmentally-aged MPs cocktail for two months. After fertilisation, behaviour, development, and growth analyses were carried out on D-larvae.

2.3 Biometric analysis and survival

A length growth monitoring was performed on adult oysters exposed to MPs for two months. A follow-up was carried out at D₀ (T₀), D₁₇ (T₁), D₃₅ (T₂) and D₅₆ (T₃). Oysters (n=30/condition) were measured (length, width, and thickness) with a digital calliper and weighted (whole weight, wet flesh and empty shell). A condition index was calculated to compare the growth of exposed oysters to control ones. Bodoy *et al.* (1986) defined the index condition by the ratio of wet flesh to whole weight minus empty shell. A survival monitoring was carried out, removing dead oysters every two days and counting the total dead oysters for each condition over the two-month period.

2.4 Microplastic analysis in adult oysters' tissues and faeces

Quality control

To avoid external contamination, key steps were implemented. The material was cleaned on numerous occasions with filtered 70 % ethanol (0.22 µm) and filtered Mili-Q water (0.22 µm). To assess the

contamination during the procedure, a blank was carried out by filtering 10 % KOH, without adding tissues. During digestion, the glass bottles with tissues were sealed with aluminium and placed under a laminar flow hood. Filters were placed in glass Petri dishes and stored at room temperature before analyzes. During the exposure period, whole tissue of oysters was collected at three time points (T₁, T₂ and T₃) and stored at -20 °C. Five pools of two oysters tissue for each condition were prepared, *i.e.*, n=5/condition at each samples times. In each condition, faeces were collected in a volume of 50 mL once a week and kept cold at -20 °C.

Sample digestion and analysis

The protocol implemented for the analyses was based on the work of Revel *et al.* (2020) ; Phuong *et al.* (2018) ; Karami *et al.* (2017) and Thiele *et al.* (2019). Oyster tissues were thawed and weighed, before being put into a 250 mL glass bottle. Then, 50 mL of filtered 10 % KOH (0.45 µm) per gram of tissue weighed (minimum 1: 5 weight/volume) were added. The bottle was sealed with aluminium and put in a stirrer for 24 hours (55 °C, 180 rpm). After complete tissue digestion, filtration was carried out through a tulip filtration unit. Fifty µm stainless steel filters (Atout Métal, France) were used to recover potential plastic particles. Filters were then incubated for 6 hours at 50 °C in a protective Petri dish.

The faeces collected once a week were pooled to correspond to the three sampling times (T₁, T₂ and T₃). They were dried for 3 hours at 60 °C, then weighed. A volume of 20 mL filtered 10 % KOH was added to a 250 mL glass bottle per milligram of faeces. Then, the bottle was put in a stirrer for 24 hours (60 °C, 180 rpm). Filtration was like the oyster tissues samples. The MP quantification in tissues and biodeposits was carried out using a binocular microscope (Motic).

2.5 Analyses of biochemical biomarkers in adult oysters

Individual sample processing

Adult oysters were removed from their experimental tank, dissected to extract shell tissue, and submerged in liquid nitrogen and stored at -80 °C for analysis. For each condition and each sampling date (T₁, T₂ and T₃), digestive glands (n=5/conditions) were homogenised in ice-cold phosphate buffer (100 mM, pH 7.2, 1100 mOsm). The homogenates were then centrifuged for 15 min at 12,500 g at 4 °C and the Final Fractions (FF), corresponding to the supernatant, were used for biochemical assays. FF was stored at -80 °C for analyzes.

Total protein concentrations

Total protein concentrations were determined adapting the BCA Kit methodology (Bicinchononique Acid Kit, Sigma Aldrich). The BCA kit contained bovine serum albumin (BSA) as a standard and involved the reduction of alkaline Cu²⁺ by proteins (Smith *et al.*, 1985) at absorbance 562 nm using a spectrofluorometer (SAFAS Flx- Xenius).

Detoxification, antioxidant, and defence enzyme activities

The SOD activity was assessed in the FF using the method developed by Paoletti *et al.* (1986). The assay, involving EDTA, MnCl₂ and mercaptoethanol, measured the decrease in nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) oxidation. The inhibition of NADH oxidation, function of the SOD activity, was monitored at 340 nm (using the SAFAS Flx-Xenius spectrofluorimeter). One SOD unit corresponded to 50% inhibition of NADH oxidation. Results are presented in U of SOD.mg of protein⁻¹.

The GST activity in the digestive glands was determined by adapting a Sigma assay kit. The Glutathione S-Transferase (GST) assay kit resorted to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), suitable for the broadest range of GST isozymes. Upon conjugation of the thiol group of glutathione to the

CDNB substrate, an increase in absorbance at 340 nm (SAFAS Flx-Xenius) was observed. Results are presented in mU of GST.mg of protein⁻¹ (Mannervik *et al.*, 1988; Habig *et al.*, 1974).

Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was measured by assaying the MDA concentration in the FF (Gerard-Monnier *et al.*, 1998). A commercially available MDA assay kit (Oxis International) was used. The method is based on the MDA reaction with a chromogenic reagent (n-methyl-2-phenylindole). The blue product was quantified by measuring absorbance at 586 nm (Gerard-Monnier *et al.*, 1998) with a SAFAS Flx-Xenius spectrofluorimeter. Results are presented in $\mu\text{M.mg prot}^{-1}$.

Environmental stress with Laccase assay

The phenoloxidase (Laccase) activity highlighted alterations to the immune system. Indeed, the enzymatic activity is sensitive to contaminants (Gagnaire *et al.*, 2004; Luna-Acosta *et al.*, 2010 and Breitwieser *et al.*, 2016) and plays an important role in the oyster immune defence mechanism. The Laccase activity was measured in the FF, using a method developed by Luna-Acosta *et al.* (2015). The latter relied on the oxidation of PPD (p-phenylenediamine) being catalysed by laccase. The reaction was measured at 420 nm using a SAFAS Flx-Xenius spectrofluorimeter. Laccase activity was expressed in enzymatic units per mg of protein (U/mg of protein).

2.6 Reproduction of adult oysters after a two-month exposure

Mature oysters were cleaned to avoid external contaminations and remove stuck microorganisms. Male and female oysters were induced to spawn by thermal stimulation (alternating immersion in FSW at 18 °C and 28 °C for 30 min) or by stripping the gonad (when thermal stimulation was ineffective) (Mai *et al.*, 2013; Gamain *et al.*, 2017; Bringer *et al.*, 2020a). Males and females were individually isolated in beakers (500 mL of FSW) at their spawning temperatures (Parker *et al.*, 2009) for 10 minutes, before being removed. Eggs and sperm from two individuals were selected to create a single pairing. To eliminate debris and faeces, both were sieved separately using 50 μm (sperm) and 100 μm (eggs) meshes (Sefar Nitex). Sperm mobility was assessed, and eggs counted under a microscope (Motic) at 100x magnification. Eggs were fertilised with sperm at a ratio of 1:10 (egg:sperm). Fertilisation success was studied under a microscope at 100x magnification, 1 hour after the start of the fertilisation. Embryos were then counted and transferred to a 24-well microplate (Greiner Bio-One, Cellstar without detectable DNase, RNase, human DNA and pyrogens) used in embryotoxicity according to previously published protocols (His *et al.*, 1999; Quiniou *et al.*, 2005) and the AFNOR standard procedure (NF ISO 17244, 2015). The fertilized eggs (approximately 300-350 eggs) were placed in wells containing 2 mL of filtered seawater (0.2 μm) and incubated in a dark climatic chamber at 24 °C for 24-, 48- and 72-hour.

2.7 Larval behaviour, development, and growth

After a 24-, 48- and 72-hour incubation, the swimming behaviour was recorded under a microscope (ZEISS Axio Observer Z1) at 100x magnification in a naturally lit air-conditioned room, set at 24 °C. Two-minute videos were recorded. For the three replicates (corresponds to three different couples with fertilisation success), results are expressed in mean \pm SEM, with 6 videos by couple, *i.e.*, n=18 videos/condition. A freeware application (VirtualDub, Windows) was used to subsample videos to 4 fps (frame per second) and convert them to AVI format (Gamain *et al.*, 2019 and Bringer *et al.*, 2020). ImageJ (1,52a software) was used to analyse the videos. These (AVI format) were first converted to grayscale image, before being transformed into a stack of binary images. Swimming parameters of numbered D-larvae, including their maximum speed (pixel/s) and trajectories, were calculated using

the wrMTrck plugin. Consequently, each larva was assigned an identification number reported in the result file. Using the protocol published by Gamain *et al.* (2019) and improved by Bringer *et al.*, 2020a, three different types of larval path were noted: (1) rectilinear; (2) circular and (3) motionless. A graphic tablet (Wacom Bamboo Pen&Touch) and image processing software (Photos, Windows 10) enabled to quantify and characterise the swimming trajectories. Once processed with a plugin, the videos were analysed to ensure each larva was only detected once. Then, 25 μL of 1 % buffered formaldehyde (Sigma- Aldrich Chemical, St. Quentin Fallavier, France) were added to each well. The percentage of abnormal D-larvae (developmental abnormalities) and developmental arrests were recorded (His *et al.*, 1999; Quiniou *et al.*, 2005) according to the standardised AFNOR procedure (NF ISO 17244, 2015). To validate the bioassays, the control condition should have contained less than 20 % of abnormal larvae (NF ISO 17244, 2015). For the three replicates (three couples of oyster genitors), results are expressed in mean \pm SEM. In each condition, twelve wells of approximately 200 D-larvae were analysed, *i.e.*, n=2400 D-larvae counted/condition.

A length growth analysis using the ImageJ software was carried out, studying larvae exposed for 24-, 48- and 72-hours (n=20/condition with three replicates, *i.e.*, a total of n=60/condition). Each larva was measured lengthwise (Talmage *et al.*, 2009; Helm *et al.*, 2006; Bringer *et al.*, 2021a). Exposed larvae were then visualised (ZEISS Axio Observer Z1, x20 objective) and photographed. Body length was determined from photographs. Results are expressed in mean \pm SEM.

2.8 Statistics

Data are expressed in mean \pm SEM. A logrank test, using the Kaplan-Meier method, was carried out to analyse the survival of adult oysters. In case of abnormal distribution, data were transformed using the following formula: $P' = \arcsin \sqrt{r}$; P corresponds to raw data (frequency of larvae abnormalities) specified in P values from 0 to 1 (Legendre and Legendre, 1998). Homogeneity of variance (Levene’s test) and normality of distribution (Shapiro-Wilk) were assessed. To compare the various treatments, an analysis of variance (ANOVA) using Tukey’s post-hoc test was performed. For data not entering in the scope of a parametric test, a statistical analysis was carried out through the Kruskal-Wallis Test. Differences in tested concentration means were then assessed using the Kruskal Nemenyi Post-hoc test with the PMCMR package (the Tukey test equivalent for non-parametric data).

Significance difference was accepted when p -value < 0.05. Statistical analysis was completed using R and graphs from Microsoft Excel.

3. Results

3.1 Analysis of MP concentrations

Table 1. Theoretical and measured MP concentrations in FSW at different sampling times.

Conditions	Sampling time	Theoretical (mg MP. L ⁻¹)	Measured (MP. μL^{-1})	Measured (MP. mL ⁻¹)
MPs cocktail	T1	0.1	0.68 \pm 0.067	677 \pm 67.6
	T2	0.1	0.66 \pm 0.05	655 \pm 53.0
	T3	0.1	0.94 \pm 0.06	943 \pm 60.7
MPs cocktail	T1	10	3.30 \pm 0.32	3,297 \pm 319.0
	T2	10	3.47 \pm 0.14	3,466 \pm 142.7
	T3	10	3.21 \pm 0.22	3,205 \pm 221.3

Through flow cytometry, the different concentrations of the MPs cocktail were measured in the experimental waters used for the exposure of adult oysters (Table 1) at different sampling times (T₁,

T₂ and T₃). At 0.1 mg MP. L⁻¹, very little variation was noted between the first two sampling times (T₁ and T₂), ranging from 655 ± 53.0 to 677 ± 67.6 MP.mL⁻¹. At T₃, the concentrations of MPs increased slightly, with 943 ± 60.7 MP.mL⁻¹. At 10 mg MP.L⁻¹, values at the three sampling times (T₁, T₂ and T₃) were stable. However, the difference in concentration factor between the two conditions of exposure to MPs seems to be lower than theory.

3.2 State of health and reproductive effort in adult oysters

To monitor growth and shape, a condition index was built from biometric measurements on adult oysters. However, there was no significant difference in the condition index between the control and exposed oysters (0.1 and 10 mg MP. L⁻¹). The delta condition index was the difference between the beginning and end of the exposure period (respectively 0.36 ± 0.03; 0.30 ± 0.02 and 0.31 ± 0.04). Following a two-month exposure, oyster mortality rate differed significantly between the three exposure conditions (0, 0.1 and 10 mg MP. L⁻¹). The control condition exhibited the lowest mortality rate of 2.2 % (n=90/condition). At 0.1 mg MP. L⁻¹, a cumulative mortality of 13.3 % was quantified. At 10 mg MP. L⁻¹, the mortality rate reached 23.3 % (Figure 3.a). Over the exposure period, the cumulative mortality rate differed significantly between the conditions tested (Figure 3.b).

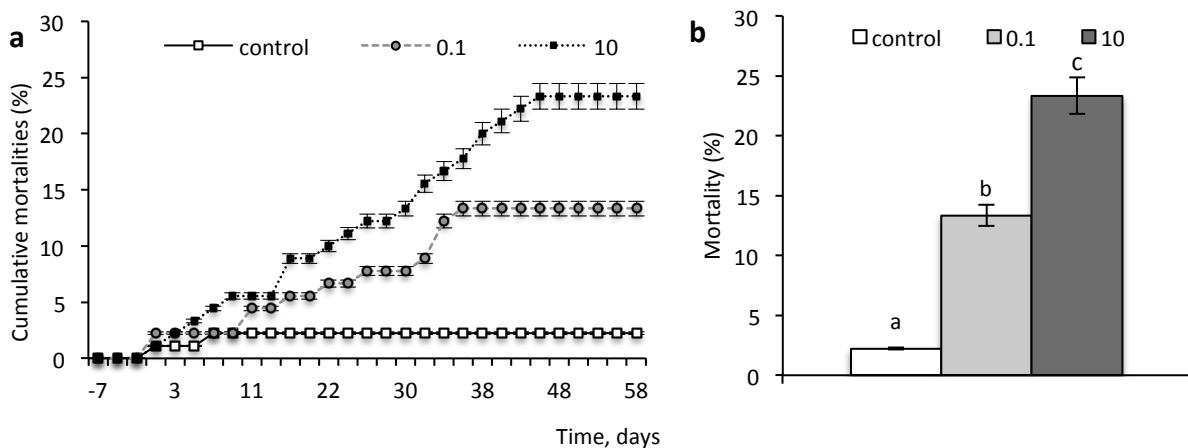


Figure 3. (a) Survival monitoring of adult oysters exposed to MPs for two months: control (without pollutants); 0.1 mg MP. L⁻¹ and 10 mg MP. L⁻¹. (b) Histogram of cumulative mortalities for each exposure condition. Expressed in mean ± SEM. Different letters indicate significant differences between concentrations ($p < 0.05$, Kaplan-Meier Test, n=90/condition).

After two months exposure under controlled laboratory conditions, some adult oysters reached sexual maturity and developed mature gonads, allowing reproduction (n=10/conditions). Six oysters from the control condition emitted gametes. Seven oysters from the 0.1 mg MP. L⁻¹ condition and 8 oysters from the 10 mg MP. L⁻¹ condition were mature and ejected gametes through thermal shock (Table S1). In terms of sex determination, oysters in the control condition were predominantly maturing females (4:2, female: male) while oysters exposed to MPs were mostly males with mature gametes (2:5 for 0.1 mg of MP. L⁻¹ and 3:5 for 10 mg of MP. L⁻¹, Table S1). The quality of gametes (well-formed oocytes and motile spermatozoa) and was observed under a microscope (Motic). In the control condition, 100 % of the gametes ejected being of good quality (Figure S2). Fifty-seven % and 50 % of the gametes from oysters exposed to 0.1 and 10 mg of MP. L⁻¹ were of good quality (Table S1). When bivalves expelled poor-quality gametes, they were not selected to proceed to *in vitro* fertilisation. Three couples for each condition (*i.e.* three replicates) were formed to obtain embryos, then becoming D-larvae.

3.3 MP analysis in adult oyster tissues and biodeposits

MPs were quantified in digested tissues and biodeposits from exposed adult oysters (Table 2).

Table 2. Concentrations of environmental MP cocktail (PE, PP and PVC) in oyster tissues (MPs.g⁻¹) and biodeposits (cumulate faeces and pseudo-faeces, MPs.mg⁻¹) at three sampling times (T₁, T₂ and T₃). Data are expressed in mean ± SEM. Different letters indicate significant differences between concentrations (*p* < 0.05, ANOVA and Tukey post-hoc test).

SAMPLING TIME	T ₁		T ₂		T ₃	
	Tissues	Biodeposits	Tissues	Biodeposits	Tissues	Biodeposits
Control	0	0	0	0	0	0
0.1 mg MP. L ⁻¹	2.1 ± 0.8 ^a	0.084 ± 0.02 ^a	6.3 ± 2.8 ^a	0.78 ± 0.2 ^a	5.4 ± 2.5 ^a	0.93 ± 0.2 ^a
10 mg MP. L ⁻¹	11.3 ± 3.6 ^b	6.4 ± 2.2 ^b	23.6 ± 9.2 ^b	7.6 ± 2.7 ^b	21.4 ± 7.3 ^b	7.3 ± 3.1 ^b

In the control oysters, there were no microplastics in the tissues for the three sampling times. In exposed oysters, MPs were detected in the tissues at all sampling times (T₁, T₂ and T₃). At T₁, a greater quantity (increase factor of 5.4) of MPs is noted in the tissues of oysters exposed to 10 mg MP .L⁻¹ compared to the 0.1 mg MP. L⁻¹ condition. Same observation at T₂ and T₃, with increase factors of 3.7 and 4 respectively. The two exposure conditions noted a decrease in the MPs present in the tissues at T₃, compared to T₂. Under the control conditions, there were no MPs in the biodeposits. In exposed oysters, MPs at T₁ were quantified as follows: 0.084 ± 0.02 at 0.1 mg of MP. L⁻¹ and 6.4 ± 2.2 MPs.mg⁻¹ at 10 mg of MP. L⁻¹. At T₂ and T₃, the MPs in the biodeposits were markedly increased compared to T₁.

3.4 Analysis of biochemical biomarkers in the adult oyster digestive gland

Figure 4 presents biomarker results on adult oysters exposed to environmental MPs (cocktail of HDPE, PVC and PP from oyster farming). SOD and GST activities are both induce under oxidative stress. The MDA activity is defined as lipid peroxidation and the LAC activity as environmental stress.

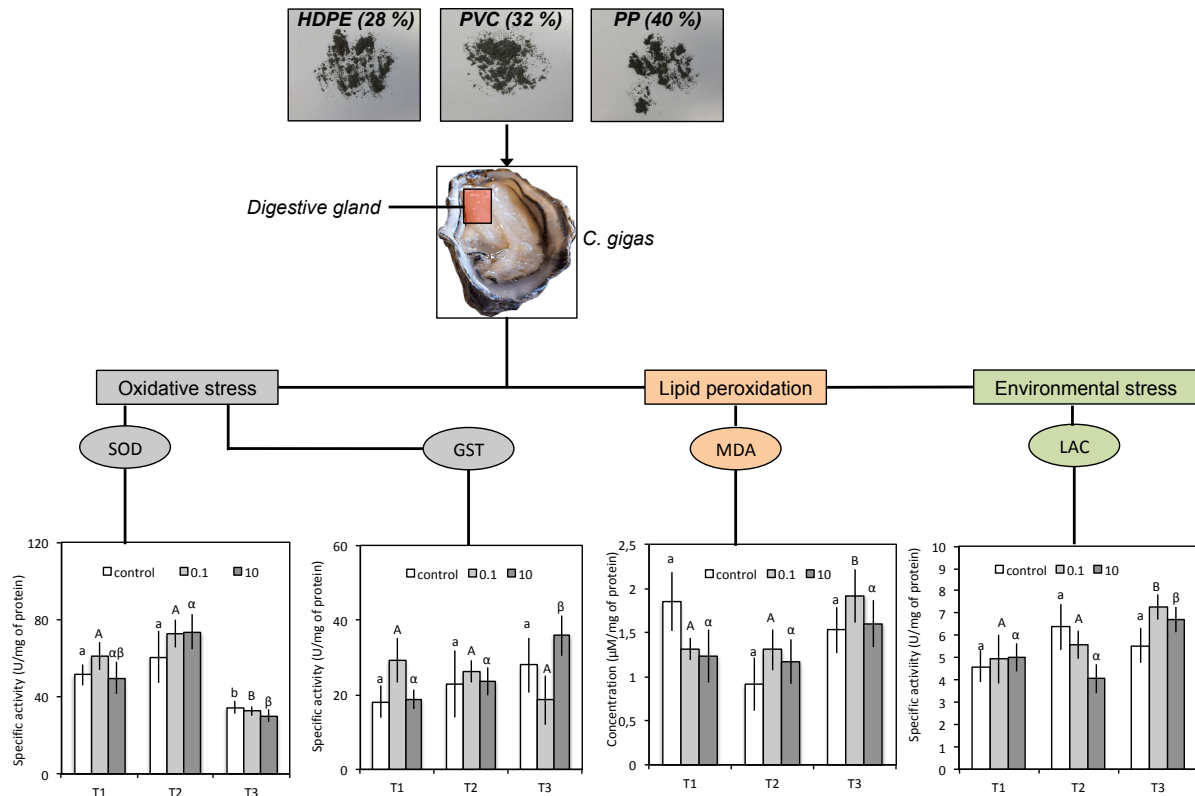


Figure 4. Effects of environmental MPs on oxidative stress (Superoxide Dismutase (SOD) and Glutathione S-transferase (GST)), lipid peroxidation (Malondialdehyde (MDA) and environmental stress Laccase (LAC) in *C. gigas* adult digestive gland. The different sampling times correspond to: T₁ (D₁₇), T₂ (D₃₅) and T₃ (D₅₆). Three MP conditions were tested: 0 (control), 0.1 and 10 mg MP. L⁻¹. The histogram data are expressed in mean ± SEM. Within series, the letters (a/b, A/B and α/β) above each bar indicate significant differences ($p < 0.05$, ANOVA and Tukey test, $n=5/\text{condition}$) between different sampling times for each condition.

Superoxide Dismutase (SOD) and Glutathione S-transferase (GST) assays: oxidative stress

The SOD activity in oysters from the three conditions tested (control, 0.1 and 10 mg MP. L⁻¹) decreased significantly at T₃ (respectively 34.3 ± 3.3 , 32.6 ± 2.5 and 30.0 ± 3.3 U/mg of protein), in comparison with T₁ (respectively 51.4 ± 5.4 , 60.9 ± 7.0 and 49.7 ± 8.3 U/mg of protein) and T₂ (respectively 60.5 ± 13.4 , 72.8 ± 7.2 and 73.5 ± 20.5 U/mg of protein; ANOVA, $p < 0.01$). Both the control and exposed oysters followed similar trends. It cannot be concluded that there is a significant difference in SOD activity at T₃ for the exposure conditions because the control condition follows the same trend. The GST activity in control condition had no significant change at the three sampling times (ANOVA, $p=0.9$). The trend was like oysters exposed to 0.1 mg MP. L⁻¹, observing no significant difference between the three sampling times (ANOVA, $p=0.5$). In the 10 mg MP. L⁻¹ condition, the GST activity increased at T₃ (35.9 ± 5.4 U/mg of protein; ANOVA, $p < 0.05$, Figure 4).

Malondialdehyde (MDA) assay: lipid peroxidation

In the control and 10 mg MP. L⁻¹ conditions, the MDA activity in oysters had no significant difference at the three sampling times (respectively, ANOVA, $p=0.2$ and $p=0.9$). In the 0.1 mg MP. L⁻¹ condition, the MDA activity increased between T₂ (1.3 ± 0.2 μM/mg of protein) and T₃ (1.9 ± 0.3 μM/mg of protein; ANOVA, $p < 0.05$) (Figure 4).

Laccase (LAC) assay: environmental stress

In control oysters, there were no significant differences of laccase activity between the three sampling times. The activity in oysters exposed to MPs (0.1 and 10 mg MP. L⁻¹) increased significantly between T₂ (respectively 5.6 ± 0.6 and 4.1 ± 0.6 U/mg of protein) and T₃ (respectively 7.3 ± 0.6 and 6.7 ± 0.6 U/mg of protein; ANOVA, $p < 0.05$, Figure 4).

3.5 Larval behaviour, development, and growth

The recorded videos (ZEISS Axio Observer Z1) highlighted a swimming activity (maximum swimming speed) increasing with the larvae age. The swimming speed was faster in 72-hour than for 24-hour larvae (Figure 5). Compared to control larvae (153.3 ± 12.2 μm. s⁻¹), 24-hour D-larvae (Figure 5.a) from exposed adult oysters swam significantly slower (respectively 97.6 ± 9.0 and 93.1 ± 5.0 μm. s⁻¹ at 0.1 and 10 mg MP. L⁻¹). 48-hour larvae (Figure 5.b) from parents exposed to 0.1 mg MP. L⁻¹ had a lower swimming activity. 72-hour larvae (Figure 5.c) from parents exposed to the highest MP concentration (10 mg MP. L⁻¹, 155.6 ± 26.4 μm. s⁻¹) swam slower than oyster larvae from other conditions (respectively 194.5 ± 12.2 and 158.5 ± 16.0 μm. s⁻¹ in the control and 0.1 mg MP. L⁻¹ conditions). In addition, over a two-month period, the swimming trajectories of larvae from exposed parents were characterised (Figure 5). 24-hour D-larvae from unexposed parents (control condition) displayed rectilinear swimming trajectories (60.6 ± 6.4 %, Figure 5.a). Forty-eight- and 72-hour larvae had predominant rectilinear swimming paths (57.5 ± 12.4 % and 54.3 ± 5.8 % respectively, Figure 5.b & c). Twenty-four-hour D-larvae from parents exposed to 0.1 and 10 mg MP. L⁻¹ mainly swam in circular trajectories, for 47.4 ± 8.1 and 65.0 ± 8.9 % of the larvae, respectively (Figure 5.a). Forty-eight-hour D-larvae from the 0.1 mg MP. L⁻¹ condition showed predominant circular trajectories (61.8 ± 7.4 %), in higher proportion than the control condition (32.5 ± 10.4 %). D-larvae from the 10 mg MP. L⁻¹ condition had motionless trajectories (31.1 ± 6.0%), in higher proportion than the control condition (10.0 ± 3.8%, Figure 5.b). 72-hour larvae from parents exposed to 0.1 and 10 mg MP. L⁻¹ displayed fewer rectilinear trajectories (respectively, 28.6 ± 9.4 and 23.8 ± 6.5 %), in comparison with larvae from the control condition (54.3 ± 5.8 %, Figure 5.c).

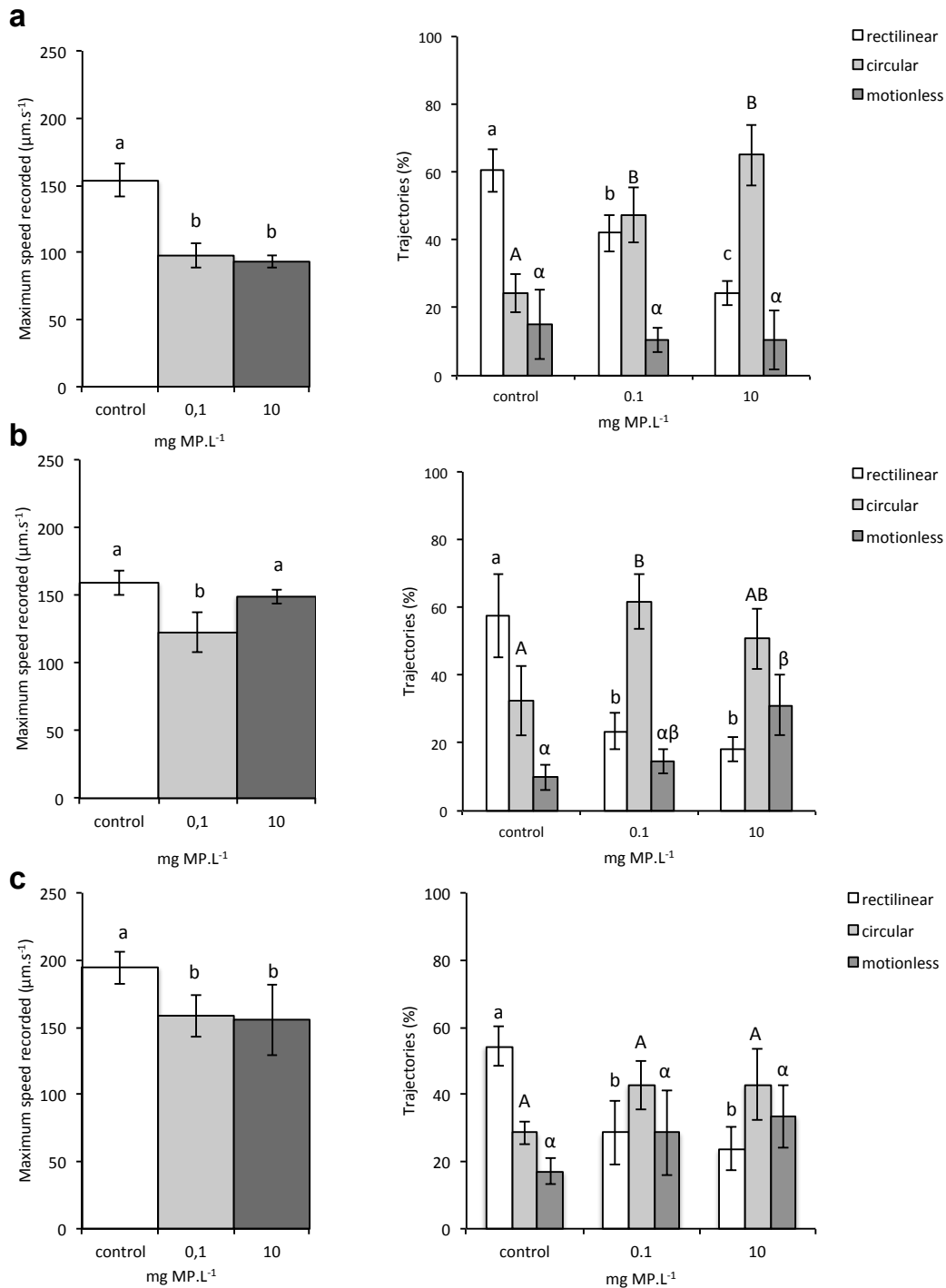


Figure 5. Maximum speed and trajectories (rectilinear, circular, or motionless) of 24- (**a**), 48- (**b**) and 72-hour (**c**) D-larvae from adult oysters exposed for two months to 0 (control), 0.1 and 10 mg MP. L⁻¹. For the tree replicates (*i.e.* three couples), values are expressed in mean ± SEM. Different letters indicate significant differences between concentrations ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis and Nemenyi post-hoc test for maximum recorded speed and ANOVA and Tukey post-hoc test for the trajectory statistical analysis, $n=18$ videos/condition).

After being fixed with formalin (1 %), 72-h D-larvae were classified according to their developmental states (well-formed, malformed or in developmental arrest, Figure 6). D-larvae from unexposed adult oysters were well-formed (85.8 ± 1.4 %) and statistically different ($p < 0.05$) from oysters exposed to 0.1 ($p < 0.01$) (81.1 ± 1.3 %) and 10 mg MP. L⁻¹ ($p < 0.01$) (74.2 ± 1.7 %). Malformed D-larvae from the

control and 0.1 mg MP. L⁻¹ conditions were not statistically different, with respectively 8.5 ± 1.2 and 11.8 ± 1.0 % ($p=0.08$). On the contrary, malformed larvae in the 10 mg MP. L⁻¹ condition were significantly higher than in the control condition (16.0 ± 1.8 % ($p<0.01$)). In addition, D-larvae with developmental arrest had no significant difference between the first two conditions (control and 0.1 mg MP. L⁻¹, with respectively 5.7 ± 0.7 and 7.1 ± 0.9 %, $p=0.6$). In comparison with the control condition ($p=0.03<0.05$), the 10 mg MP. L⁻¹ condition differed significantly, with 9.8 ± 1.2 %. Representative photographs of malformed and developmental arrest larvae are presented in Figure 7.

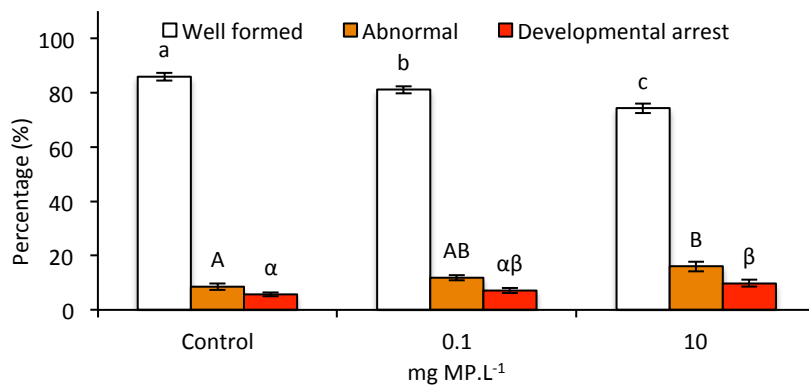


Figure 6. Percentages of well-formed, abnormal and developmental arrest in 72-hour *C. gigas* larvae. Over a two-month period, genitor oysters were exposed to three conditions: 0 (control), 0.1 and 10 mg MP. L⁻¹. For the three replicates, values are expressed in mean ± SEM. Different letters indicate significant differences between concentrations ($p < 0.05$, ANOVA and Tukey test, n=2400 larvae/condition).

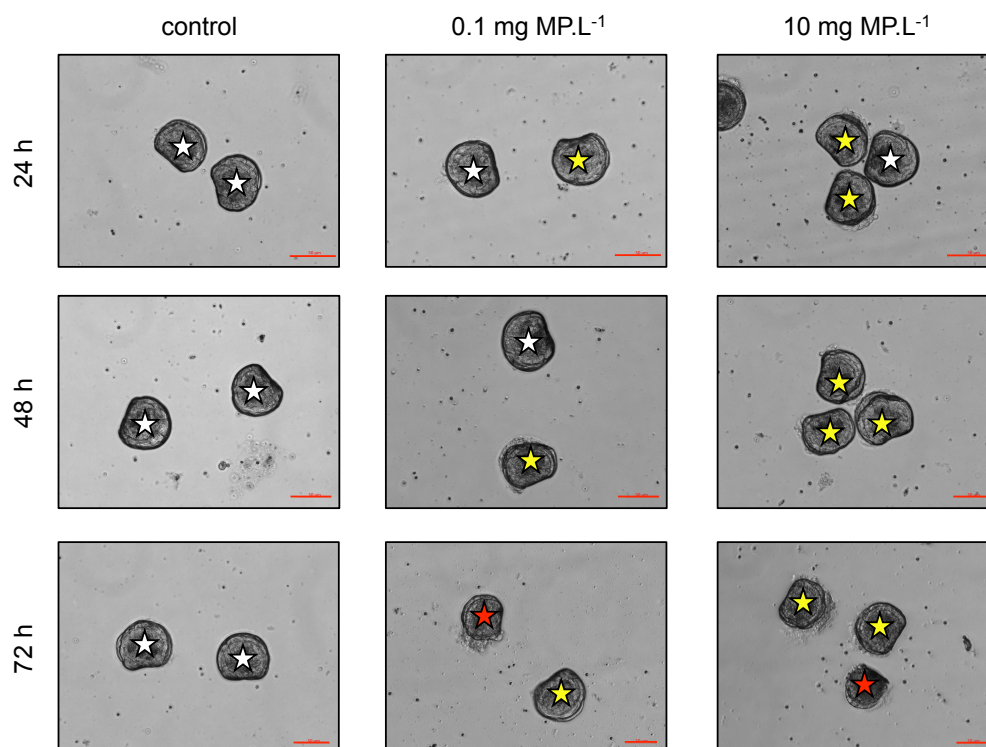


Figure 7. Photographs of normal (white stars), abnormal *C. gigas* D-larvae (yellow stars) and developmental arrest (red stars) after a 24-, 48- and 72-hour exposure to 0 (control), 0.1 and 10 mg MP. L⁻¹ with ZEISS Axio Observer Z1 (x20). Red scale bars = 50 µm.

Larval growth was slower in exposed than in control larvae (Figure 8). Significant differences of size reductions of 10.6 % and 12.3 %, were observed in 72-hour larvae from parents exposed to 0.1 and 10 mg MP. L⁻¹. The total length of control D larvae was 63.0 ± 1.5 µm, and significantly greater than larvae of parents exposed to 0.1 mg MP. L⁻¹ and up to 10 mg MP. L⁻¹ measured 56.3 ± 1.0 µm and 55.3 ± 0.8 µm.

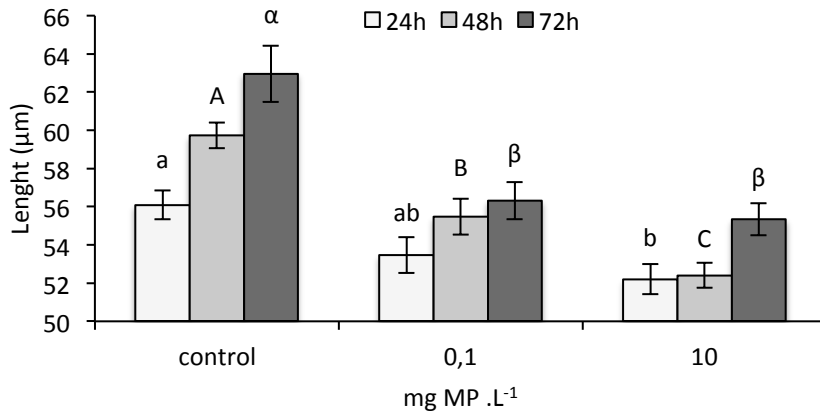


Figure 8. Larva total length (µm) of *C. gigas* after 24-, 48- and 72-h of development from parents exposed for 2 months to different concentrations of MPs cocktail: 0 (control), 0.1 and 10 mg MP. L⁻¹. Values are means ± SEM. Different letters indicated significant differences between different concentrations and development time ($p < 0.05$, ANOVA and Tukey test, $n=60$ /condition).

4. Discussion

The study aimed at evaluating the effects of environmentally-aged MPs (plastic materials from oyster farms) on *C. gigas* oysters. Over a two-month period, adult oysters were exposed to aged MPs obtained from a mixture of HDPE, PP and PVC. Their growth, survival, MP ingestion/excretion and the response of biomarkers were monitored. Adult oysters were fertilised in laboratory conditions to produce embryos. Then, the development and swimming activity of 72-hour oyster D-larvae (early stages of development) were observed. MP concentrations in the exposure medium were assessed through flow cytometry. Except for the 0.1 mg MP. L⁻¹ condition at T₃, concentrations measured were constant. In the latter condition at T₃, the increase in MP concentration over time might be due to particles binding on the tank walls while water was renewed (Summers *et al.*, 2018). Our present study focused on ecotoxicological test concentrations, stronger than what is found in the marine environment (Lenz *et al.*, 2016; Paul-Pont *et al.*, 2018). The previous study by Dubaish and Liebezeit (2013) determined concentrations in the North Sea of 1.7 MP.mL⁻¹ (MP > 80 µm). In our work, the ranges of concentrations assayed reported means of 758 ± 60 and 3,322 ± 228 MP.mL⁻¹ for the two theoretical mass concentrations (0.1 and 10 mg MP. L⁻¹). It is therefore estimated that our study would have used concentrations 445 and 1,954 higher than the natural environment. However, our concentrations are close to certain ecotoxicological studies that took into account doses of 1,000 MP.mL⁻¹ (Sussarellu *et al.*, 2016 and Paul-Pont *et al.*, 2016).

According to literature, MP loads in seawater are within the µg.L⁻¹ range, and the highest MP loads reported in the sea area round 0.08 to 0.3 mg.L⁻¹ (Lusher *et al.*, 2014; Frias *et al.*, 2014). Thereby, the theoretical 0.1 mg MP. L⁻¹ concentration correspond to the contamination peak of MPs in the marine environment (Beiras *et al.*, 2018). A recent study in the Bay of Biscay (South-West, Atlantic, France) near the study area where our MPs were collected indicated MP concentrations between 0.03 and 0.06 MP.L⁻¹ in water, with a size distribution between 4-2,000 µm, at the surface of the studied marine

environment (Lerebours *et al.*, 2021). Wang *et al.* (2021), reported higher concentrations of 15-20 MP.L⁻¹ in seawater from the coastal areas in Zhuhai (China), with a size range of 101-500 µm for 45 % of the detected MPs.

MPs were not detected in tissues of control oysters. Like most animals, oysters lack enzymes and enzymatic pathways enabling to break down plastics (Aladaileh *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2013). After filtration-ingestion, MPs cannot be absorbed or used as energy, leading to their accumulation in the gills and digestive gland (Teng *et al.*, 2020). This work echoed previous results highlighting that bivalve accumulated MPs in both experimental and natural conditions (Browne *et al.*, 2008; Von Moos *et al.*, 2012; Magni *et al.*, 2018; Teng *et al.*, 2019; Birnstiel *et al.*, 2019 and Ward *et al.*, 2019). The presence of MPs accumulated in the tissues at the end of exposure (T₃) could potentially affect reproductive efforts and subsequently the quality of the gonads and embryo-larval development (Sussarellu *et al.*, 2016). One must recognize that the concentrations tested and MP in tissues were much higher than those in the environment (Keisling *et al.*, 2020). Regarding the quantities of MPs contained in the biodeposits, these present results are comparable to the results published by Revel *et al.* (2020). Oysters tended to quickly excrete MPs (Graham *et al.*, 2019). In a recent study (Thomas *et al.*, 2020), MPs were detected in tissues and biodeposits. Oysters could excrete MPs in faeces through cleaning processes, preventing the gills from being clogged by particles (Jorgensen, 1981) and rejecting indigestible particles (Wegner *et al.*, 2012). Our results indicate low amounts of MPs in faeces, with concentrations of the order of 0.1-0.9 and 6.4-7.6 MP.mg⁻¹ of faeces for 0.1 and 10 mg MP. L⁻¹ respectively tested. Although this suggests that oysters might excrete MPs through feces, a small fraction of these microparticles might persist in the tissues or be re-ingested by filtration, potentially leading to longer-term effects (Farrel and Nelson, 2013; Ribeiro *et al.*, 2017).

In the present study, MP exposure of adult oysters did not affect their growth, but their survival. The highest dose of exposure (10 mg MP. L⁻¹) led to a significant increase of mortality rate. Sussarellu *et al.* (2016) obtained similar results, showing that oysters exposed to PS-MPs had disrupted energy flows, metabolism and homeostasis, increasing the mortality rate. Browne *et al.* (2013) reported in *Arenicola marina*, accumulation of nonylphenol and triclosan from PVC that led to altered physiological stress, immune system responses and increasing mortality. Stabilisation of mortality were noted at 35 and 44 days for oysters exposed to respectively 0.1 and 10 mg MP. L⁻¹. The evolution in cumulative mortality of exposed individuals may suggest an adaptation to MP exposure (Guo *et al.*, 2015). In addition, an impact on fertilisation success was noted. The oysters exposed to MPs, having reached the stage of sexual maturation, had more males than females, unlike the control oysters. In addition, the quality of female gametes was poorer in adults exposed to MPs than in control. A previous study revealed that marine medaka (*Oryzias melastigma*) exposed to PS-MPs faced sex-specific endocrine disruption. Wang *et al.* (2019) suggested that PS-MPs had sex-specific reproductive disruption and decreased sex hormone levels in female plasma by inhibiting their synthesis. Sussarellu *et al.* (2016) indicated that the quality of gametes decreased following parental exposure to PS-MPs. This work reached similar conclusions on the quality of gametes from exposed parents.

The activities of biomarkers (SOD, GST, MDA and LAC) that can be modulated by environmental pollutants were used as defense markers, providing information on the level of exposure and the response capacities of oysters exposed to cocktail of MPs. Oxidative stress biomarkers were chosen for their early stress responses in bivalves (Valavanidis *et al.* 2006). Depending on the biomarkers tested, the responses in the digestive glands indicated significant differences according to MP exposure conditions. Milinkovitch *et al.* (2015) confirmed that SOD was an early indicator of oxidative stress. The absence of increase in the SOD activity in our study. In all conditions – particularly in the control condition – at T₃, a decrease in the SOD activity was noted. These results led to no conclusions. In their study, Revel *et al.* (2019) indicated that the SOD activity in the

digestive gland of blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed for 10 days to a mixture of MPs (PE, PP) was not affected. Our results show a decrease in SOD over time and with increasing gonadal maturity in all conditions tested, including condition control. Similar effects have been demonstrated in *C. gigas* with a decrease in SOD due to seasonal variations (Luna-Acosta *et al.*, 2010). In contrast to this study, Ribeiro *et al.* (2017) revealed that the SOD activity in the digestive gland of *Scrobicularia plana* exposed to PS-MPs increased at the end of the exposure period.

Under the condition exposed to 10 mg MP .L⁻¹ at T₃, an increase in GST activity was observed. GST is involved both in the biotransformation of xenobiotics (Dos Santos *et al.*, 2021) but also in the recycling of reduced glutathione and therefore in the fight against oxidants (Fabioux *et al.*, 2015). This phenomenon could be a reaction to an increased xenobiotic biotransformation, as underlined by Breitwieser *et al.* (2016). Excessive oxidative stress can lead to a significant increase in oxidative damage (Araújo *et al.*, 2016), potentially due to the depletion of organisms due to the activation of defense mechanisms to fight against the polluted environment. Concerning the GST enzyme, also linked to oxidative stress, an increase in this enzymatic activity was noted in freshwater clams *Corbicula fluminea* exposed to PS-NP (Li *et al.*, 2020). GSTs are key players in the removal of reactive oxygen species (ROS), intervening indirectly by controlling the level of reduced glutathione.

If the balance is upset in favor of ROS, oxidative stress is generated due to environmental stress and xenobiotics could influence this balance by catalyzing the production of ROS, and altering the metabolic balance (Donaghy *et al.*, 2015; Manduzio *et al.*, 2015). In addition, Wang *et al.* (2019) noted an increased GST activity in the intestine and gills of the marine medaka (*Oryzias melastigma*) exposed to 20 and 200 µg PS-MP. L⁻¹, concentrations like this study.

The MDA content reflects the rate and intensity of lipid peroxidation (Qiao *et al.*, 2019a, b). In the 0.1 mg MP. L⁻¹ condition at T₃, the MDA content increased. The increase in MDA content, decreased the antioxidant protection and immune modulation (Pan *et al.*, 2009; Breitwieser *et al.*, 2016). Indeed, Sussarellu *et al.* (2016) and Palais *et al.* (2012) suggested that oysters exposed to particles can modify their energy flow and induced antioxidant and detoxification processes.

Laccase (LAC) is a marker of environmental stress (Luna-Acosta *et al.*, 2010). In the two exposure conditions (0.1 and 10 mg MP. L⁻¹) at T₃, the LAC activity increased over time. The environmental study conducted by Breitwieser *et al.* (2020) correlated an increase of the LAC activity in *Mimachlamys varia* over time in presence of metals (Cu, Cr, Mn, Sn, and As). Bivalves can detect pollutants in their environment and respond to stress by increasing their LAC activity (Luna-Acosta *et al.*, 2015). At T₃ – the last sampling time – LAC and MDA biomarkers were significantly increased in comparison to control group. Exposure to MPs should be investigated on a long-term basis to understand adaptive responses or toxic effects on bivalves. Understanding mechanisms triggered by organisms to fight against chronic exposure to MPs is key to conduct risk assessments. It is crucial as coastal areas are constantly impacted by plastics (Santana *et al.*, 2018).

The present study also focused on the offspring obtained from adult oysters exposed to MPs over a two-month period during gametogenesis (Enriquez-Díaz *et al.*, 2009). The larval growth was slower in the MPs-exposed groups in comparison to the control group. This result is consistent with those obtained by Sussarellu *et al.* (2016) and Bringer *et al.* (2020b), suggesting that MPs exposure can delay *C. gigas* larval growth. In this work, the exposure conditions revealed a significant increase in developmental abnormalities, including malformations and developmental arrest. Thus, when parents were exposed to high MP concentrations, developmental abnormalities were more frequent in their offspring. A lot of studies highlighted that micro-pollutants such as heavy metals and pesticides, caused developmental defects in oysters (Mai *et al.*, 2012; Gamain *et al.*, 2016, 2017; Bringer *et al.*, 2021b). Tallec *et al.* (2018) reported greater toxicity of smaller plastic particles. In comparison with PS-MPs (2 µm), PS-NPs (500 and 50 nm) had greater impacts on the fertilisation success and embryo-

larval development of oyster *C. gigas*. Our results revealed a shift in the swimming behaviour of larvae from parents exposed to MPs. Indeed, circular trajectories increased, in comparison to rectilinear trajectory. Gamain *et al.* (2020) demonstrated that, under optimal developmental conditions, *C. gigas* D-larvae tended to have a rectilinear swimming behaviour (2-D analysis). In a previous study, Bringer *et al.* (2020a) noted that circular trajectories were significantly increased in larvae exposed to HDPE-MPs (4-13 µm). For both MP concentrations, a decrease in maximum speed recorded was noted in 24- and 72-hour D-larvae. These results are consistent with previous studies (Bringer *et al.*, 2020a & b) in which D-larvae exposed to MPs (HDPE and polymer cocktail) showed a decrease in maximum swimming speed. Yin *et al.* (2019) indicated that black rockfish *Sebastes schlegelii* exposed to MPs (0.19 mg PS-MP. L⁻¹ of 15 µm) had a restricted swimming speed and range of motion, affecting their hunting behaviour and exploration skill.

Altogether our data reinforced the hypothesis that MPs impacted both the physiology and behaviours of oysters *C. gigas*. This study relied on the use of secondary MPs – aged in the marine environment – as well as on plastic materials from oyster farming.

5. Conclusions and perspectives

To conclude, this experiment showed that the cocktail of MPs obtained from oyster material and aged in the marine environment can be toxic for adult oysters and the larval generation. The results indicated that exposure to MPs could affect survival, responses to defense biomarkers, and fertilization success, in adults (*C. gigas*) exposed for 2-months. D-larvae obtained from exposed oysters, having reached a mature stage, exhibited alterations in swimming behavior, development and growth. Bad weather and degradation of plastics from mariculture could therefore represent a possible threat to oyster farming and surrounding marine life. In the future, it would be useful to study the life cycle of aquaculture plastics and the potential risk of additives present on plastics on the *Crassostrea gigas* study model and the health of marine ecosystems in general.

Acknowledgements

Arno Bringer received a PhD grant (Comité Régional de la Conchyliculture de la Charente-Maritime CRC17) as well as financial support from the Région Nouvelle Aquitaine and Comité Départemental de la Charente Maritime (CD17) to develop this research. The AQUAECO project (Amélioration de la QUALité Environnementale sur les zones CONchylicoles des Pertuis Charentais), funded by a partnership with CRC17 and OFB (French Biodiversity Office), contributed to this study. The funding was partly supported by the University of La Rochelle, the University of Bordeaux, the Centre National de la Recherche Scientifique (France). The authors thank the France Naissain hatchery for the oyster specimens as well as Oriane Titeca for her proofreading services.

References

- Aladaileh, S., Nair, S. V., Birch, D., & Raftos, D. A. (2007). Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function. *Journal of invertebrate pathology*, 96(1), 48-63.
- Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 62(8), 1596-1605.
- Araújo, R.F.F. de, Martins, D.B.G., Borba, M.A.C.S.M., 2016. Oxidative stress and disease. In: Morales-Gonzalez, J.A., Morales-Gonzalez, A., Madrigal-Santillan, E.O. (Eds.), A Master Regulator of Oxidative Stress - the Transcription Factor Nrf2. InTech.
- Bakir A, Rowland S J, Thompson R C (2014). Transport of persistent organic pollutants by microplastics in estuarine conditions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 140, 14-21.
- Barnes DKA, Galgani F, Thompson RC, Barlaz M (2009) Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos. Trans. R. Soc.* B364, 1985–1998.
- Bayne B L, Ahrens M, Allen S K, D’auriac M A, Bacheljau T, Beninger P, Bohn R, Boudry P, Davis J, Green T, Guo X, Hedgecock D, Ibarra A, Kingsley-

- Smith P, Krause M, Langdon C, Lapegue S, Li C, Manahan D, Mann R, Perez-Paralle L, Powell E N, Rawson P D, Speiser D, Sanchez J-L, Shumway S, Wang H (2017) The proposed dropping of the genus *Crassostrea* for all pacific cupped oysters and its replacement by a new genus *Magallana*: a dissenting view. *J. Shellfish Res.* 36 (3), 545-548.
- Bayne B, d’Auriac M A, Backeljau T, Beninger P, Boudry P, Carnegie R, Langdon C (2019) A scientific name for Pacific oysters. *Aquaculture* 499, 373.
- Beiras, R., Bellas, J., Cachot, J., Cormier, B., Cousin, X., Engwall, M., Gambardella, C., Garaventa, F., Keiter, S., Le Bihanic, F., Lopez-Ibanez, S., Piazza, V., Rial, D., Tato, T., Vidal-Liñán, L. (2018). Ingestion and contact with polyethylene microplastics does not cause acute toxicity on marine zooplankton. *Journal of hazardous materials*, 360, 452-460.
- Birnstiel, S., Soares-Gomes, A., & da Gama, B. A. (2019). Depuration reduces microplastic content in wild and farmed mussels. *Marine pollution bulletin*, 140, 241-247.
- Bodoy, A., Prou, J., & Berthome, J. P. (1986). Etude comparative de différents indices de condition chez l’huître creuse (*Crassostrea gigas*). *Haliotis*, 15, 173-182.
- Bonanno, G., & Orlando-Bonaca, M. (2018). Perspectives on using marine species as bioindicators of plastic pollution. *Marine pollution bulletin*, 137, 209-221.
- Breitwieser, M., Viricel, A., Graber, M., Murillo, L., Becquet, V., Churlaud, C., ... & Thomas-Guyon, H. (2016). Short-term and long-term biological effects of chronic chemical contamination on natural populations of a marine bivalve. *PLoS one*, 11(3), e0150184.
- Breitwieser, M., Barbarin, M., Plumejeaud-Perreau, C., Dubillot, E., Guyot, T., Huet, V., Churlaud, C., Coulombier, T., Brenon, I., Fichet, D., Imbert, N., Thomas, H. (2020). Biomonitoring of *Mimachlamys varia* transplanted to areas impacted by human activities (La Rochelle Marina, France). *Chemosphere*, 243, 125199.
- Bringer A, Thomas H, Prunier G, Dubillot E, Bossut N, Churlaud, Clerandau C, Le Bihanic F, Cachot J (2020a) High density polyethylene (HDPE) microplastics impair development and swimming activity of Pacific oyster D-larvae, *Crassostrea gigas*, depending on particle size. *Environmental Pollution*, 260, 113978.
- Bringer, A., Cachot, J., Prunier, G., Dubillot, E., Clérandeau, C., & Thomas, H. (2020b). Experimental ingestion of fluorescent microplastics by pacific oysters, *Crassostrea gigas*, and their effects on the behaviour and development at early stages. *Chemosphere*, 126793.
- Bringer, A., Thomas, H., Prunier, G., Dubillot, E., Clérandeau, C., Pageaud, M., & Cachot, J. (2021a). Toxicity and risk assessment of six widely used pesticides on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Science of The Total Environment*, 146343.
- Bringer, A., Le Floch, S., Kerstan, A., & Thomas, H. (2021b). Coastal ecosystem inventory with characterization and identification of plastic contamination and additives from aquaculture materials. *Marine Pollution Bulletin*, 167, 112286.
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., & Thompson, R. C. (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental science & technology*, 42(13), 5026-5031.
- Cho, Y., Shim, W. J., Jang, M., Han, G. M., & Hong, S. H. (2019). Abundance and characteristics of microplastics in market bivalves from South Korea. *Environmental pollution*, 245, 1107-1116.
- CNC (Comite National de la Conchyliculture), 2020. <http://www.cnc-france.com/La-Production-francaise.aspx> (accessed December 2020).
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2588-2597.
- Cole M, Galloway T S (2015) Ingestion of nanoplastics and microplastics by pacific oyster larvae. *Environ. Sci. Technol.* 49 (24), 14625–14632.
- Conger, K. A., Swift, M. L., Reeves III, J. B., & Lakshmanan, S. (1978). Shell growth of unfed oysters in the laboratory: a sublethal bioassay system for pollutants. *Life sciences*, 22(3), 245-254.
- Cormier, B., Gambardella, C., Tato, T., Perdriat, Q., Costa, E., Veclin, C., Le Bihanic, F., Grassl, B., Dubocq, F., Karrman, A., Van Arkel, K., Lemoine, S., Lagarde, F., Morin, B., Garaventa, F., Faimali, M., Cousin, X., Bégout, M.L., Cachot, J. (2021). Chemicals sorbed to environmental microplastics are toxic to early life stages of aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111665.
- Donaghy, L., Hong, H.-K., Jauzein, C., Choi, K.-S., 2015. The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 91-97.
- Dos Santos, R. N., Machado, B. R., Hefler, S. M., & Zanette, J. (2021). Glutathione S-transferase activity in aquatic macrophytes and halophytes and biotransformation potential for biocides. *Journal of Plant Research*, 1-8.
- Dubaish, F., & Liebezeit, G. (2013). Suspended microplastics and black carbon particles in the Jade system, southern North Sea. *Water, air, & soil pollution*, 224(2), 1-8.
- Enders K, Lenz R, Stedmon CA, Nielsen TG (2015) Abundance, size and polymer composition of marine microplastics > 10 µm m in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. *Mar. Pollut. Bull.* 100 (1), 70-81.

- Enriquez-Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., & Le Pennec, M. (2009). Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquaculture International*, 17(5), 491.
- Fabioux, C., Sulistiyani, Y., Haberkorn, H., Hégaret, H., Amzil, Z., & Soudant, P. (2015). Exposure to toxic *Alexandrium minutum* activates the detoxifying and antioxidant systems in gills of the oyster *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae*, 48, 55-62.
- Farrell, P., & Nelson, K. (2013). Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). *Environmental pollution*, 177, 1-3.
- Frias, J. P. G. L., Otero, V., & Sobral, P. (2014). Evidence of microplastics in samples of zooplankton from Portuguese coastal waters. *Marine Environmental Research*, 95, 89-95.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., & Renault, T. (2004). In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, 16(4), 501-512.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Pardon, P., Tapie, N., Gourves, P.Y., Budzinski, H., Morin, B., 2016. Combined effects of pollutants and salinity on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 113, 31-38.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Cle_randeau, C., Mazzella, N., Gourves, P.Y., Morin, B., 2017. Combined effects of temperature and copper and S-metolachlor on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Pollut. Bull.* 115 (1-2), 201-210.
- Gamain, P., Rome_ro-Ramirez, A., Gonzalez, P., Mazzella, N., Gourves, P.Y., Compan, C., Morin, B., Cachot, J., 2019. Assessment of swimming behavior of the Pacific oyster D-larvae (*Crassostrea gigas*) following exposure to model pollutants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1-11.
- Gardon, T., Huvet, A., Paul-Pont, I., Cassone, A. L., Koua, M. S., Soyez, C., Jezequel, R., Receveur, J., Le Moullac, G. (2020). Toxic effects of leachates from plastic pearl-farming gear on embryo-larval development in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Water Research*, 115890.
- Gerard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Chaudiere, J., Yadan, J., 1998. Method of colorimetric analysis of malonic dialdehyde and 4-hydroxy-2-enaldehydes as indexes of lipid per-oxidation, kits for carrying out said method, substituted indoles for use in said method and their preparation. US Patent No. US5726063. United States Patent and Trademark Office, Washington, DC.
- Gigault, J., Pedrono, B., Maxit, B., Ter Halle, A., 2016. Marine plastic litter: the unanalyzed nano-fraction. *Environ. Sci.: Nano* 3 (2), 346-350.
- Gorman, D., Moreira, F. T., Turra, A., Fontenelle, F. R., Combi, T., Bicego, M. C., & de Castro Martins, C. (2019). Organic contamination of beached plastic pellets in the South Atlantic: Risk assessments can benefit by considering spatial gradients. *Chemosphere*, 223, 608-615.
- Graham, P., Palazzo, L., de Lucia, G. A., Telfer, T. C., Baroli, M., & Carboni, S. (2019). Microplastics uptake and egestion dynamics in Pacific oysters, *Magallana gigas* (Thunberg, 1793), under controlled conditions. *Environmental pollution*, 252, 742-748.
- Guo, X., He, Y., Zhang, L., Lelong, C., & Jouaux, A. (2015). Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation. *Fish & shellfish immunology*, 46(1), 107-119.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Halpern, B.S., Walbridge, S., Selkoe, K.A., Kappel, C.V., Micheli, F., D'Agrosa, C., Bruno, J.F., Casey, K.S., Ebert, C., Fox, H.E., Fujita, R., Heinemann, D., Lenihan, H.S., Madin, E.M.P., Perry, M.T., Selig, E.R., Spalding, M., Steneck, R., Watson, R. (2008). A global map of human impact on marine ecosystems. *science*, 319(5865), 948-952.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., 2006. Hatchery operation: culture of larvae basic methodology, feeding and nutrition, factors influencing growth and survival, and settlement and metamorphosis. Hatchery Culture of Bivalves: A Practical Manual. *FAO Fisheries Technical Paper* (471).
- Hermabessiere, L., Dehaut, A., Paul-Pont, I., Lacroix, C., Jezequel, R., Soudant, P., & Duflos, G. (2017). Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. *Chemosphere*, 182, 781-793.
- 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 (7), 1706-1718.
- Jambeck, J., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T.R., Perryman, M., Andrady, A.L., Narayan, R., Law, K.L., 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* 347, 768-771.
- Jin-Feng, D. I. N. G., Jing-Xi, L. I., Cheng-Jun, S. U. N., Chang-Fei, H. E., Jiang, F. H., Feng-Lei, G. A. O., & Zheng, L. (2018). Separation and identification of microplastics in digestive system of bivalves. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 46(5), 690-697.
- Jørgensen, C. B. (1981). Feeding and cleaning mechanisms in the suspension feeding bivalve *Mytilus edulis*. *Marine biology*, 65(2), 159-163.
- Karami, A., Golieskardi, A., Choo, C. K., Romano, N., Ho, Y. B., & Salamatinia, B. (2017). A high-performance

protocol for extraction of microplastics in fish. *Science of the Total Environment*, 578, 485-494.

Keisling, C., Harris, R. D., Blaze, J., Coffin, J., & Byers, J. E. (2020). Low concentrations and low spatial variability of marine microplastics in oysters (*Crassostrea virginica*) in a rural Georgia estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110672.

Lambert, S., Wagner, M., 2016. Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene. *Chemosphere* 145, 265-268.

Law, K. L., Morét-Ferguson, S., Maximenko, N. A., Proskurowski, G., Peacock, E. E., Hafner, J., & Reddy, C. M. (2010). Plastic accumulation in the North Atlantic subtropical gyre. *Science*, 329(5996), 1185-1188.

Lebreton, L. C., Van Der Zwet, J., Damsteeg, J. W., Slat, B., Andrady, A., & Reisser, J. (2017). River plastic emissions to the world’s oceans. *Nature communications*, 8(1), 1-10.

Legendre, P., Legendre, L., 1998. Transformation:1-4. *Numer. Ecol.*

Lenz, R., Enders, K., & Nielsen, T. G. (2016). Microplastic exposure studies should be environmentally realistic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(29), E4121-E4122.

Lerebours, A. et al., 2021. Étude spatio-temporelle de la contamination en microplastiques chez les moules et les huîtres en mer des Pertuis : hétérogénéité ?. Oral communication on Polymers & Oceans congress.

Li J, Yang D, Li L, Jabeen K, Shi H (2015) Microplastics in commercial bivalves from China. *Environ. Pollut.* 207, 190–195.

Li, Z., Feng, C., Wu, Y., & Guo, X. (2020). Impacts of nanoplastics on bivalve: Fluorescence tracing of organ accumulation, oxidative stress and damage. *Journal of Hazardous Materials*, 122418.

Luna-Acosta, A., Rosenfeld, E., Amari, M., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante, P., Thomas-Guyon, H., 2010. First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 28:719–726.

Luna-Acosta, A., Bustamante, P., Godefroy, J., Fruitier-Arnaudin, I., & Thomas-Guyon, H. (2010). Seasonal variation of pollution biomarkers to assess the impact on the health status of juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* exposed in situ. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(4), 999-1008.

Luna-Acosta, A., Bustamante, P., Budzinski, H., Huet, V., & Thomas-Guyon, H. (2015). Persistent organic pollutants in a marine bivalve on the Marennes-Oléron Bay and the Gironde Estuary (French Atlantic Coast)-Part 2: Potential biological effects. *Science of The Total Environment*, 514, 511-522.

Lusher, A. L., Burke, A., O’Connor, I., & Officer, R. (2014). Microplastic pollution in the Northeast Atlantic

Ocean: validated and opportunistic sampling. *Marine pollution bulletin*, 88(1-2), 325-333.

Lusher, A., Hollman, P., & Mendoza-Hill, J. (2017). *Microplastics in fisheries and aquaculture: status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety*. FAO.

Magni, S., Gagné, F., André, C., Della Torre, C., Auclair, J., Hanana, H., Parenti, C.C., Bonasoro, F., Binelli, A. (2018). Evaluation of uptake and chronic toxicity of virgin polystyrene microbeads in freshwater zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalvia). *Science of the Total Environment*, 631, 778-788.

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 (12), 2663-2670.

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.

Manduzio, H., Rocher, B., Durand, F., Galap, C., Leboulenger, F., 2015. The point about oxidative stress in molluscs. *Invertebr. Surviv. J.* hal 32.

Mannervik, B., Helena-Danielson, U., Ketterer, B., 1988. Glutathione transferases—structure and catalytic activity. *Crit. Rev. Biochem.* 23:283–337.

Naik, R. K., Naik, M. M., D’Costa, P. M., & Shaikh, F. (2019). Microplastics in ballast water as an emerging source and vector for harmful chemicals, antibiotics, metals, bacterial pathogens and HAB species: A potential risk to the marine environment and human health. *Marine pollution bulletin*, 149, 110525.

NF ISO 17244, 2015. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité d'échantillons aqueux sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et de la moule (*Mytilus edulis* ou *Mytilus galloprovincialis*).

O’Connor, T. P. (2002). National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. *Marine Environmental Research*, 53(2), 117-143.

Pannetier, P., Morin, B., Le Bihanic, F., Dubreil, L., Clérandeau, C., Chouvellon, F., Van Arkel, K., Danion, M., Cachot, J. (2020). Environmental samples of microplastics induce significant toxic effects in fish larvae. *Environment international*, 134, 105047.

Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., Caparrini, A., 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 154:536–541.

Parker, L.M., Ross, P.M., O’Connor, W.A., 2009. The effect of ocean acidification and temperature on the fertilization and embryonic development of the Sydney

- rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850). *Glob. Chang. Biol.* 15 (9), 2123-2136.
- Paul-Pont, I., Lacroix, C., Fernández, C. G., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Frere, L., Cassone, A.L., Sussarellu, R., Fabioux, C., Guyomarch, J., Albentosa, M., Huvet, A., Soudant, P. (2016). Exposure of marine mussels *Mytilus spp.* to polystyrene microplastics: toxicity and influence on fluoranthene bioaccumulation. *Environmental pollution*, 216, 724-737.
- Paul-Pont, I., Tallec, K., Gonzalez-Fernandez, C., Lambert, C., Vincent, D., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J.L., Brotons, G., Lagarde, F., Fabioux, C., Soudant, P., Huvet, A. (2018). Constraints and priorities for conducting experimental exposures of marine organisms to microplastics. *Frontiers in Marine Science*, 5, 252.
- Pérez-Albaladejo, E., Solé, M., & Porte, C. (2020). Plastics and plastic additives as inducers of oxidative stress. *Current Opinion in Toxicology*.
- Phuong, N. N., Zalouk-Vergnoux, A., Kamari, A., Mouneyrac, C., Amiard, F., Poirier, L., & Lagarde, F. (2018). Quantification and characterization of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*): protocol setup and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(7), 6135-6144.
- Phuong N N, Poirier L, Pham Q T, Lagarde F, Zalouk-Vergnoux A (2018) Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: Location, season and/or mode of life? *Marine Pollution Bulletin* 129, 664-674.
- PlasticsEurope, 2020. Plastics - the Facts 2020. An Analysis of European Plastics. Production, Demand and Waste Data. <https://www.plasticseurope.org/fr/resources/publications/4312-plastics-facts-2020>
- Quiniou, F., His, E., Delesmont, R., Caisey, X., 2005. Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux : bio-essai “développement embryo-larvaire de bivalve”. In: Ifremer (Ed.), Méthodes d’analyse en milieu marin.
- Quiniou, F., Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Geffard, A., Mouneyrac, C., Budzinski, H., & Roméo, M. (2007). Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. *Environment international*, 33(1), 27-33.
- Revel, M., Lagarde, F., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Akcha, F., Sussarellu, R., Rouxel, J., Costil, K., Decottignies, P., Cognie, B., Châtel, A., Mouneyrac, C. (2019). Tissue-specific biomarker responses in the blue mussel *Mytilus spp.* exposed to a mixture of microplastics at environmentally relevant concentrations. *Frontiers in Environmental Science*, 7, 33.
- Revel, M., Châtel, A., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Akcha, F., Sussarellu, R., Rouxel, J., Costil, K., Decottignies, P., Cognie, B., Lagarde, F., Mouneyrac, C. (2020). Realistic environmental exposure to microplastics does not induce biological effects in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine pollution bulletin*, 150, 110627.
- Ribeiro, F., Garcia, A.R., Pereira, B.P., Fonseca, M., Mestre, N.C., Fonseca, T.G., Ilharco, L.M., Bebianno, M.J. (2017). Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. *Mar. Pollut. Bull.* 122, 379–391.
- Robinson, A., 1992. Gonadal cycle of *Crassostrea gigas* kumamoto (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture* 106 (1), 89-97.
- Rochman C M, Browne M A, Halpern B S, Hentschel B T, Hoh E, Karapanagioti H K, Rios- Mendoza L M, Takada H, Teh S, Thompson R C (2013) Policy: classify plastic waste as hazardous. *Nature* 494, 169–171.
- Santana, M. F., Moreira, F. T., Pereira, C. D., Abessa, D. M., & Turra, A. (2018). Continuous exposure to microplastics does not cause physiological effects in the cultivated mussel *Perna perna*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 74(4), 594-604.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76–85.
- Summers, S., Henry, T., & Gutierrez, T. (2018). Agglomeration of nano-and microplastic particles in seawater by autochthonous and de novo-produced sources of exopolymeric substances. *Marine pollution bulletin*, 130, 258-267.
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M.E.J., Goïc, N.L., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Charlotte, C., Julien, G., Johan, R., Ika, P.-P., Philippe, S., Arnaud, H., 2016. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113 (9), 2430-2435.
- Sussarellu R, Lebreton M, Rouxel J, Akcha F, Riviere G (2018) Copper induces expression and methylation changes of early development genes in *Crassostrea gigas* embryos. *Aquat. Toxicol.* 196, 70-78.
- Tallec K, Huvet A, Di Poi C, Gonzalez-Fernandez C, Lambert C, Petton B, Le Goïc N, Berchel M, Soudant P, Paul-Pont I (2018) Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos. *Environ. Pollut.* 242, 1226-1235.
- Talmage, S.C., Gobler, C.J., 2009. The effects of elevated carbon dioxide concentrations on the metamorphosis, size, and survival of larval hard clams (*Mercenaria mercenaria*), bay scallops (*Argopecten irradians*), and Eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *Limnol. Oceanogr.* 54 (6), 2072-2080.
- Teng, J., Wang, Q., Ran, W., Wu, D., Liu, Y., Sun, S., Liu, H., Cao, R., Zhao, J. (2019). Microplastic in cultured

oysters from different coastal areas of China. *Science of The Total Environment*, 653, 1282-1292.

Teng, J., Zhao, J., Zhu, X., Shan, E., Zhang, C., Zhang, W., & Wang, Q. (2020). Toxic effects of exposure to microplastics with environmentally relevant shapes and concentrations: Accumulation, energy metabolism and tissue damage in oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental Pollution*, 269, 116169.

Thiele, C. J., Hudson, M. D., & Russell, A. E. (2019). Evaluation of existing methods to extract microplastics from bivalve tissue: Adapted KOH digestion protocol improves filtration at single-digit pore size. *Marine pollution bulletin*, 142, 384-393.

Thomas, M., Jon, B., Craig, S., Edward, R., Ruth, H., John, B., Dick, V.A., Heather, L.A., Matthew, S. (2020). The world is your oyster: low-dose, long-term microplastic exposure of juvenile oysters. *Heliyon*, 6(1), e03103.

Van Cauwenberghe L & Janssen CR (2014) Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environ. Pollut.* 193, 65–70

Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., & Köhler, A. (2012). Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. *Environmental science & technology*, 46(20), 11327-11335.

Wagner, M., Scherer, C., Alvarez-Munoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., Fries, E., Grosbois, C., Klasmeier, J., Marti, T., Rodriguez-Mozaz, S., Urbatzka, R., Vethaak, A., Winther-Nielsen, M., Reifferscheid, G., 2014. Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what we need to know. *Environ. Sci. Eur.* 26 (1), 12.

Wang, J., Li, Y., Lu, L., Zheng, M., Zhang, X., Tian, H., Wang, W., Ru, S. (2019). Polystyrene microplastics cause tissue damages, sex-specific reproductive disruption and transgenerational effects in marine

medaka (*Oryzias melastigma*). *Environmental Pollution*, 254, 113024.

Wang, D., Su, L., Ruan, H. D., Chen, J., Lu, J., Lee, C. H., & Jiang, S. Y. (2021). Quantitative and qualitative determination of microplastics in oyster, seawater and sediment from the coastal areas in Zhuhai, China. *Mar. Pollut. Bull.*, 164, 112000.

Ward, J. E., Zhao, S., Holohan, B. A., Mladinich, K. M., Griffin, T. W., Wozniak, J., & Shumway, S. E. (2019). Selective ingestion and egestion of plastic particles by the blue mussel (*Mytilus edulis*) and eastern oyster (*Crassostrea virginica*): implications for using bivalves as bioindicators of microplastic pollution. *Environmental science & technology*, 53(15), 8776-8784.

Wegner, A., Besseling, E., Foekema, E. M., Kamermans, P., & Koelmans, A. A. (2012). Effects of nanopolystyrene on the feeding behavior of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(11), 2490-2497.

Wright SL, Thompson RC, Galloway TS (2013) The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environ. Pollut.* 178, 483–492.

Yin, L., Liu, H., Cui, H., Chen, B., Li, L., Wu, F., 2019. Impacts of polystyrene microplastics on the behavior and metabolism in a marine demersal teleost, black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *J. Hazard Mater.* 380, 120861.

Zapata-Restrepo, L. M., Hauton, C., Williams, I. D., Jensen, A. C., & Hudson, M. D. (2019). Effects of the interaction between temperature and steroid hormones on gametogenesis and sex ratio in the European flat oyster (*Ostrea edulis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 236, 110523.

Zarfl C, Matthies M (2010) Are marine plastic particles transport vectors for organic pollutants to the Arctic? *Mar. Pollut. Bull.* 60 (10), 1810–1814.

RÉSULTATS MAJEURS

- ⇒ Effets des MP d’origine ostréicole sur la survie des huîtres adultes après 2 mois d’exposition contrôlée : mortalités plus importantes pour les huîtres soumises aux MP.
- ⇒ Pas d’effets sur la croissance et les indices de condition.
- ⇒ Augmentation de l’activité Laccase, synonyme d’augmentation des défenses immunitaires intracellulaires, en réponse à la présence de MP dans les tissus. Augmentation de l’activité GST et du taux de peroxydation lipidique pour les huîtres exposées respectivement à 0,1 et 10 mg MP.L⁻¹.
- ⇒ Effets des MP sur le succès de fécondation et sur la génération F1 au stade larvaire (anomalies de développement, comportement natatoire et retard de croissance).
- ⇒ Hypothèse : les MP vieilliss enclencheraient une réponse immunitaire renforcée, puisant les réserves énergétiques des géniteurs pendant la période de gamétogénèse, impactant indirectement la survie et le développement de la descendance.

CHAPITRE VI - Discussion générale

A. Les microplastiques et les pesticides affectent-ils les stades précoces de développement chez l’huître creuse (*C. gigas*) ?

B. Les microplastiques et les pesticides influencent-ils les stades plus tardifs chez l’huître creuse (*C. gigas*) ?

C. La pollution plastique des Pertuis Charentais encore mal connue

D. Les enjeux environnementaux et sociétaux : conchyliculture et contaminants

1. Les enjeux liés aux microplastiques
 2. Les enjeux liés aux pesticides
-

Depuis une cinquantaine d'années, les macroplastiques sont rejetés dans les environnements naturels et notamment les écosystèmes aquatiques. La négligence des sociétés humaines sur la gestion de la fin de vie des plastiques, conduit à des accumulations et des persistances des plastiques dans les mers et océans (Ostle *et al.*, 2019). En 2004, l'étude portée par Thompson *et al.* (2004) révèle le terme « microplastiques », qui est le résultat de la fragmentation des macroplastiques en plus petits fragments ou particules, avec des tailles relativement petites et difficilement visibles à l'œil nu. La problématique « microplastiques (MP) » est alors étudiée davantage par la communauté scientifique, et les premières études, mettant en évidence des effets de ces microparticules, commencent à voir le jour. Cole *et al.* (2011) ont permis de montrer que les MP atteignent le milieu aquatique par déversement des effluents industriels ou domestiques ou par le ruissellement des eaux de pluie.

Les pesticides sont largement utilisés dans le monde entier, comme agents de contrôle des espèces envahissantes (Banks *et al.*, 2005 ; Okamura *et al.*, 2000). Des solutions commerciales, régulièrement utilisées, comprennent des herbicides pour lutter contre les mauvaises herbes, des insecticides pour lutter contre les insectes, des fongicides pour contrôler certains types de maladies des plantes et les agents antisalissures (antifouling) pour inhiber la fixation ou la croissance des organismes sur la coque des bateaux. Les pesticides diffèrent de nombreuses autres substances environnementales préoccupantes et potentiellement toxiques. Ils sont utilisés, à des fins spécifiques, par l'agriculture avant de pénétrer dans l'environnement.

Les résidus de pesticides peuvent être rejetés dans les écosystèmes aquatiques à la suite de pulvérisation, de lessivage ou de ruissellement des zones urbaines (*e.g.* routes, parkings et zones résidentielles) et agricoles (*e.g.* épandage). Le ruissellement de surface est considéré comme l'un des modes de transport majeur des pesticides vers les eaux de surface (Larson *et al.*, 1995 ; Liess *et al.*, 1999). La contamination par les pesticides a été largement documentée dans les eaux et sédiments des zones estuariennes et/ou côtières européennes (Sargent *et al.*, 2000 ; Thomas *et al.*, 2000 ; Zhou, 2008). Une fois que les résidus de pesticides pénètrent dans l'environnement, ils peuvent rester dans les milieux aquatiques de quelques heures à plusieurs mois ou années selon leurs natures et donc leurs propriétés physico-chimiques et les conditions du milieu. En 2008, la France s'est engagée à atteindre le « bon état écologique » (BEE) de ses zones marines côtières d'ici 2020, à la suite de l'adoption de la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (Galvani *et al.*, 2013a).

Des études de toxicité antérieures ont montré que les polluants environnementaux (*e.g.* les pesticides organochlorés et les métaux lourds) pouvaient causer une toxicité distincte, telle qu'une malformation embryonnaire, une différenciation sexuelle et une perturbation endocrinienne, à différents stades de développement, au cours de la vie entière (Leet *et al.*, 2011 ; Imhof *et al.*, 2017 ; Silva *et al.*, 2018). Cependant, peu d'attention a été accordée à la comparaison des effets toxiques des MP aux différents stades de développement tout au long de l'histoire de la vie, en particulier pour les organismes, comme les bivalves marins, comprenant des métamorphoses au cours de leur développement (Luan *et al.*, 2019). Les mollusques bivalves marins, filtreurs dominants, maintiennent la structure et la fonction de l'écosystème benthique, par le recrutement, le développement et les différents cycles de vie (Tallec *et al.*, 2018), et représentent de bons indicateurs biologiques de la pollution marine (Wallace & Luoma, 2003).

Dans ce contexte, l'huître creuse (*C. gigas*) a donc été utilisée comme organisme modèle pour nos expérimentations. La discussion générale reprend donc les principaux résultats du volet expérimental du projet AQUAECOs. En premier lieu, l'exposition aux MP commerciaux a permis de mettre en évidence les effets néfastes sur le développement et le comportement natatoire au stade embryon-

larvaire chez l’huître creuse, *C. gigas*. Les concentrations testées restent fortes par rapport aux concentrations détectées dans l’environnement. Les pesticides d’intérêt potentiellement dosés dans les Pertuis Charentais, ont montré des effets toxiques, à des concentrations proches de celles retrouvées dans l’environnement. De plus, les larves pédivéligères ont été affectées par les MP d’origine ostréicoles sur leur phase de fixation et la croissance à court terme. Dans un second temps, l’étude de l’activité valvaire a mis en évidence des anomalies valvométriques chez les naissains d’huître creuse, à la suite d’expositions à des MP de type HDPE, à des herbicides et à des mélanges des deux familles de contaminants chimiques. Pour finir, les huîtres creuses adultes, ont été exposées par les MP d’origine ostréicoles, durant la période de gamétogénèse, pendant deux mois pour évaluer des potentiels effets intergénérationnels sur les stades larvaires issus des adultes préalablement soumis à une contamination subchronique en MP environnementaux. Enfin, les résultats issus de l’étude préliminaire menée sur le site littoral des Pertuis Charentais en termes de pollutions aux plastiques (macro & micro) seront également présentés dans la discussion générale. L’ensemble des données proposé dans cette thèse a été valorisé (*i.e.* publié ou en cours) sous forme d’articles scientifiques sur les différents stades de vie étudiés de l’huître creuse (Figure 43).

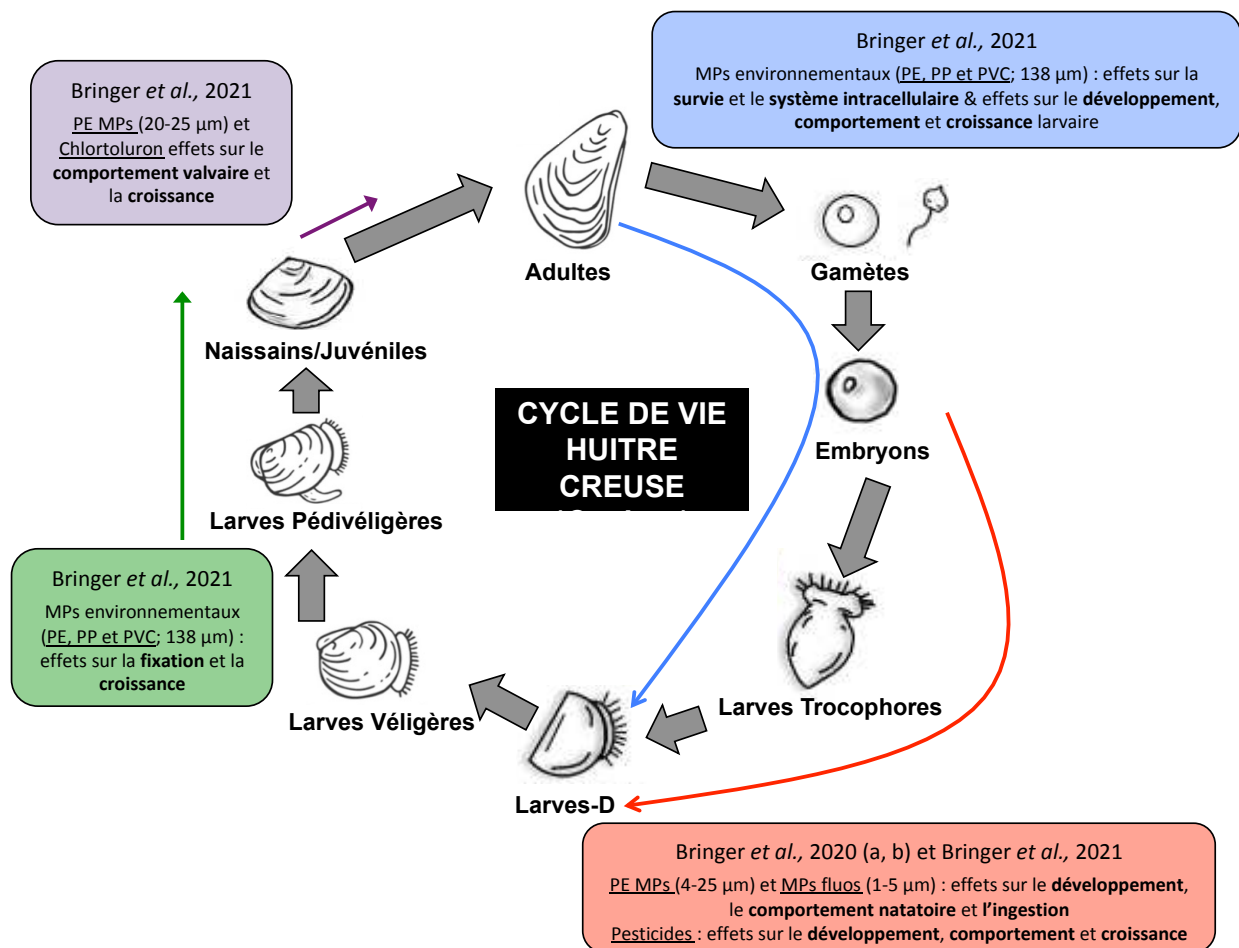


Figure 43. Cycle de vie de l’huître creuse (*C. gigas*), montrant les différents résultats collectés durant les travaux de thèse sur les effets des MP et pesticides. Modifié d’après Vogeler *et al.* (2016) et Luan *et al.* (2019).

L’ensemble de ces travaux de thèse aura aussi permis d’interagir avec les professionnels de la filière conchylicole. La restitution des résultats et observations obtenus dans cette étude aux acteurs de terrain a été effectuée tout au long de la thèse pour répondre à l’objectif final de cette étude (1)

proposer des actions concrètes pour limiter l'usage des outils plastiques ostréicoles et (2) communiquer plus généralement sur l'amélioration de la qualité de l'eau à proximité des zones conchylicoles.

A. Les microplastiques et les pesticides affectent-ils les stades précoces de développement chez l'huître creuse (*C. gigas*) ?

La communauté scientifique s'est intéressée aux effets des MP/NP de PS sur les stades précoces de développement chez l'huître creuse, *C. gigas* (Sussarellu *et al.*, 2016 ; Tallec *et al.*, 2018 ; Cole & Galloway, 2015 ; González-Fernández *et al.*, 2018). Avec une demande industrielle de matériaux plastiques en constante augmentation, en Europe, le PS représente 6,2 % alors que le HDPE représente une demande de 12,4 % (PlasticsEurope, 2020). Une étude antérieure a montré que les PE étaient présents à 42 % dans les eaux de surface des écosystèmes marins et que le PS était présent en très petite quantité (Erni-Cassola *et al.*, 2019). Un autre exemple provient d'une recherche menée par Kor & Mehdinia (2020) qui a évalué l'abondance de plastique dans les eaux de surface du Golfe Persique et a révélé que la majorité des plastiques collectés étaient du PE (48 %) et du PP (28 %). Plus localement, l'étude de Phuong *et al.* (2018a), dans les sédiments intertidaux du Golfe de Gascogne (Atlantique, sud-ouest, France), a montré la présence de 38 % de PP et 24 % de PE (fragments > 100 µm). Dans ce contexte, il semblait important de considérer les potentiels effets des MP en PE sur les jeunes stades de vie chez l'huître creuse (Figure 44), d'autant plus que ce matériel plastique est régulièrement utilisé par les professionnels ostréicoles, *i.e.* les poches de grossissement (Lusher *et al.*, 2017). **Nos expérimentations menées en conditions contrôlées ont mis en évidence des effets notables des MP commerciaux en HDPE en fonction de la taille des particules testées.** Effectivement les plus petites tailles de MP (4-6 et 11-13 µm) ont engendré une toxicité aigüe sur le stade embryo-larvaire avec des anomalies de développement et comportementale après 24 h de développement. Les MP en HDPE ont montré des LOEC (« Lowest Effect Concentration », *i.e.* concentration la plus faible ayant montré un effet) à 0,1 mg MP.L⁻¹.

Alors que des effets ont été constatés à 24 h de développement, une expérimentation semblable a été entreprise sur les larves-D à 72 h de développement afin d'observer les potentiels effets liés à l'ingestion des MP (1-5 µm) (Figure 44). **Nos analyses ont démontré une ingestion des MP commerciaux fluorescents, stockés dans le tractus digestif des larves-D d'huître creuse, mais pas d'effet sur le développement et le comportement natatoire à 72 h du développement larvaire.** L'ingestion n'était pas dépendante du temps d'exposition mais dépendante de la concentration testée, *i.e.* plus les larves étaient mises en contact d'une forte concentration de MP, et plus on a retrouvé de MP dans le tractus digestif. Ces résultats sont comparables à l'étude menée par Cole & Galloway (2015) où des larves de 3 jours ont ingéré des microparticules de PS de 1,84–7,3 µm. Les larves-D sembleraient avoir tendance à accumuler les MP présents dans leur environnement mais excréteraient aussi très rapidement ces MP. La forme des MP utilisés pourrait aussi jouer un rôle : la forme sphérique et lisse des MP favoriserait une excrétion rapide par les larves, limitant la rétention et donc les perturbations physiques pouvant mener à des effets néfastes (Frydkjær *et al.*, 2017 ; Mazurais *et al.*, 2015). Cependant, **nos observations ont pu révéler la présence d'agglomérats de MP au niveau des cils locomoteurs des larves-D âgées de 24 h** (HDPE et MP fluorescents) quelle que soit la taille testée (1-5 ; 4-6 et 11-13 µm). Les MP contribueraient à induire une toxicité physique/mécanique sur les vingt-quatre premières heures de développement, lorsque les larves-D d'huître creuse se nourrissent *via* leurs réserves vitellines. Une observation semblable a été réalisée

avec la présence de MP « collés » sur le manteau de nauplii d'*Artemia franciscana* (Kokalj *et al.*, 2018). L'étude menée par Le Bihanic *et al.* (2020) a montré que les MP de HDPE (4-6 µm) avaient tendance à s'agréger à la surface des oeufs de Médaka marin (*Oryzias melastigma*) créant un contact avec les villosités et le chorion, pouvant potentiellement transférer des contaminants à travers l'embryon. Il a été prouvé également que, dans l'environnement naturel, les MP formeraient facilement des agglomérats (Summers *et al.*, 2018), comme cela a pu être observé dans nos différentes études.

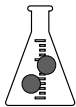







	TAILLES	POLYMERES	TYPE	0 h	24 h	72 h	17 jours
Commercial 	4-6 µm 11-13 µm 20-25 µm	HDPE	Particulaire				
					LOEC = 0,1 mg/L Malformations larvaires		
					LOEC = 0,1 mg/L Arrêt de développement		
					LOEC = 10 mg/L Malformations larvaires		
Commercial 	1-5 µm	50 % PVT 50 % ? <i>Confidentialité industrielle</i>	Particulaire		LOEC = 0,1 mg/L Vitesse maximale de nage	LOEC > 10 mg/L	
					Agglomérats collés sur les cils locomoteurs	Ingestion dans le tractus digestif	
Environnemental 	138,6±2 µm	Cocktail HDPE PP PVC	Particulaire				LOEC = 10 mg/L Ratio de fixation Croissance modifiée
Environnemental 	138,6±2 µm	HDPE PP PVC	Élutriat (eau de mer)		LOEC = 30 g/L Malformations larvaires		
					PVC plus toxique Additifs potentiellement rejetés		

Figure 44. Effets des MP commerciaux et environnementaux sur les jeunes stades de vie (larves-D et pédivéligères) de l'huître creuse (*C. gigas*). Les LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) sont exprimées pour les paramètres les plus sensibles.

Les déchets plastiques comprennent des résidus de toute taille, des gros objets visibles et facilement observables, aux petites particules invisibles. Il existe deux sources principales de MP, les sources primaires et secondaires (Boucher & Friot, 2017). Les MP primaires pénètrent ou sont rejetés, directement, dans l'environnement sous forme de microparticules. Celles-ci sont produites par extrusion ou broyage, soit comme matière première pour la fabrication de produits (Turner & Holmes, 2015), soit pour une utilisation directe (Browne, 2015), par exemple dans les produits de nettoyage, (Cole *et al.*, 2011 ; Derraik, 2002) microbilles dans les cosmétiques (Zitko & Hanlon, 1991 ; Napper *et al.*, 2015). En revanche, les MP secondaires qui proviennent principalement de la dégradation de gros déchets plastiques, se fragmentent en particules de plastique plus petites une fois en interaction avec les contraintes environnementales (*e.g.* température, UV, salinité). De plus, cela peut inclure des MP fragmentés provenant de produits usagés (*e.g.* l'usure des pneus et les fibres des vêtements ; Cole *et al.*, 2011 ; Law & Thompson, 2014 ; Browne *et al.*, 2011). On prévoit que même si les émissions de plus gros articles en plastique dans l'environnement cessaient immédiatement, il est probable que nous assisterions toujours à une augmentation de la quantité de MP en raison de la fragmentation de

macroplastiques, contaminants chimiques qui se sont accumulées depuis des décennies dans l'environnement (Thompson, 2015).

Depuis quelques années, la profession aquacole/ostréicole utilise des matériaux/outils plastiques pour les différentes phases de production (captage, grossissement) des mollusques bivalves marins. De plus, les friches ostréicoles abandonnées (Prou *et al.*, 1994) sont de plus en plus nombreuses, avec la présence de plastiques usagés et non ramassés. Ces plastiques se retrouvent alors dans l'environnement marin lors de tempêtes, forts courants ou perte de matériels par les professionnels. Dans ce contexte, il devenait pertinent de tester les potentiels effets des MP issus des matériaux/outils ostréicoles sur l'huître creuse, *C. gigas* (Figure 44). Des essais préliminaires ont été mis au point sur l'effet d'élutriats/lixiviatés de MP environnementaux (HDPE, PP ou PVC) sur le stade embryo-larvaire (Figure 44). **Nos premières analyses ont mis en évidence des effets du PVC vieillis dans l'environnement des Pertuis Charentais sur le développement larvaire à 24 h d'huître creuse, identifiant des taux de malformations et arrêts de développement bien supérieurs à ceux obtenus pour des contaminations chimiques de MP de HDPE et PP.** L'étude menée par Gardon *et al.* (2020) a permis d'observer des effets d'élutriats de plastiques environnementaux issus de l'aquaculture sur les stades précoces de l'huître perlière, *P. margaritifera*. Dans cette même étude, les effets des plastiques « neufs » semblaient plus importants que les plastiques « vieillis ». Cela correspondrait aux additifs rejetés par les plastiques, comme les phthalates. Effectivement, une grande variété d'additifs est utilisée dans les plastiques pour améliorer leurs performances et augmenter leur polyvalence. Les plastifiants et les lubrifiants pourraient être sources importantes de toxicité, en raison de leur application au PVC (Al-Malaika *et al.*, 2017). De plus, durant le vieillissement en milieu marin, les plastiques seraient susceptibles d'accumuler et de libérer des biocides (Beiras *et al.*, 2021) et éléments traces métalliques (*e.g.* utilisés pour les colorations ; Naik *et al.*, 2019).

En ce qui concerne, les stades de vie plus avancés (larves pédivéligères, Figure 44), **nos résultats ont montré un effet des MP vieillis (mélange de HDPE, PP et PVC ; 138 µm) dans l'environnement des Pertuis Charentais, sur le rendement de fixation et sur la croissance** (Figure 44). Les données obtenues par Tallec *et al.* (2018) n'avaient pas montré d'effets des NP/MP de PS sur la métamorphose des larves pédivéligères de l'huître creuse. Cependant peu d'études se sont intéressées à la phase de fixation en conditions contrôlées de laboratoire (méthode de télécaptage ; Glize, 1992). D'après l'étude de Sussarellu *et al.* (2016), les MP pourraient induire une réduction du métabolisme énergétique chez les larves lors des expositions afin de lutter contre les particules, et engendrer des effets sur la croissance et la métamorphose chez *C. gigas*. Des analyses ont permis de détecter un épuisement énergétique chez des *Danio rerio* adultes exposés à des MP de PS (5 µm ; Chen *et al.*, 2020). D'autres résultats ont montré une diminution de l'activité et de la production énergie, lors d'exposition aux MP (Silva *et al.*, 2020 ; Teng *et al.*, 2020). Dans ce contexte, l'hypothèse retenue consisterait à penser que lors du développement larvaire de l'huître creuse, il y aurait un affaiblissement des mécanismes de défense qui fragiliseraient les larves de *C. gigas* en les rendant plus vulnérables aux effets de facteurs environnementaux biotiques et abiotiques (Thomas-Guyon *et al.*, 2009).

Une part de la pollution de l'environnement est anthropique, associée au développement industriel puisque toutes les eaux usées provenant d'activités industrielles ou agricoles sont drainées dans des plans d'eau peu/pas traités (Zahran, 2003 ; Lasee *et al.*, 2017 ; Prata, 2018). Ces rejets peuvent avoir une influence négative à la fois sur la qualité des milieux dulcicoles aussi marins. Afin d'être représentatif du secteur des Pertuis Charentais, trois pesticides régulièrement dosés dans les eaux

marines ont été testés (Nicosulfuron, Chlortoluron et Boscalid). **Nos analyses ont montré des effets délétères de ces trois contaminants chimiques, à des concentrations proches de l'environnement, sur le développement, la croissance et le comportement natatoire de *C. gigas*.** Les LOEC expérimentales étaient comprises entre 0,015 et 0,003 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Lors d'une période d'épandage et de pics de concentrations dans l'environnement marin des Pertuis Charentais, pendant la saison estivale, le classement de risque associé serait : Chlortoluron > Boscalid > Nicosulfuron. Des effets reliés aux herbicides (Glyphosate, Roundup, Diuron, S-Métolachlore) ont déjà été constatés chez les larves-D, chez l'huître creuse (Mottier *et al.*, 2013 ; Behrens *et al.*, 2016 ; Akcha *et al.*, 2012 ; Mai *et al.*, 2012 ; Gamain *et al.*, 2017). Des effets du Chlortoluron sur des algues d'eaux douces ont été observés avec une diminution de la croissance due à son action sur la photosynthèse (Valiente-Moro *et al.*, 2012). Des effets similaires ont été observés avec le Nicosulfuron, bloquant les phases de photosynthèse par action sur le photosystème II (Hassannejad *et al.*, 2020). Cependant, peu d'études se sont intéressées à leurs effets sur les stades précoces de l'huître creuse, à des concentrations environnementales. Enfin, la Boscalid engendrerait des effets sur la production d'ATP, *via* la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (Fungicide Resistance Action Committee, 2012). Son action intracellulaire serait susceptible d'induire des effets précoces chez les larves d'huître creuse (*C. gigas*), en affectant le métabolisme énergétique par exemple (Qian *et al.*, 2018). Ce fongicide est régulièrement retrouvé dans les eaux marines et fluviales (Elskus & Hackley, 2012).

Ces nombreux travaux, nous ont permis de mieux appréhender les différents effets que pouvaient engendrer les MP et pesticides. Les MP semblent affecter le stade embryo-larvaire *via* des actions mécaniques/physiques, avec altération de la locomotion et des malformations pouvant mener à des arrêts de développement. L'ingestion des microparticules ne semble pas induire d'effet toxique sur les larves d'huître creuse dans les premiers jours de développement. En revanche, les pesticides semblent être nocifs à des concentrations proches de l'environnement par rapport aux MP, et engendreraient des effets délétères sur le comportement, le développement et la croissance *via* des actions intracellulaires. Cependant, un certain nombre de pistes restent à explorer afin de mieux comprendre les modes d'actions de ces contaminants chimiques, chez les jeunes stades de vie de l'huître creuse, *C. gigas*. Effectivement, les modes d'actions toxiques des MP environnementaux sur les stades larvaires pédivélégères, sont à étudier plus précisément. Les impacts sur la fixation et la croissance pourraient être dus à un affaiblissement du métabolisme énergétique des larves-D. De plus, il devient urgent de s'intéresser plus largement aux substances retrouvées dans l'environnement naturel en prenant en compte des concentrations environnementales pertinentes, ainsi que des expositions et suivis à plus long terme. Les combinaisons « cocktail », avec d'autres polluants environnementaux, semblent pertinentes à considérer sur le plan expérimental pour l'avenir.

B. Les microplastiques et les pesticides affectent-ils les stades plus tardifs chez l'huître creuse (*C. gigas*) ?

Comme explicité dans la synthèse bibliographique, les crises de mortalités ostréicoles des dix dernières années, se sont concentrées sur les stades de vie naissain principalement et adulte (Soletchnik *et al.*, 2018). Afin de mieux comprendre les interactions entre MP/pesticides et *Crassostrea gigas*, deux études distinctes ont été menées, (i) sur le stade naissain durant une exposition de 24 jours au HDPE commerciaux (20-25 μm) et l'herbicide Chlortoluron ; (ii) ainsi que sur le stade adulte, durant la période de gamétogénèse, pendant deux mois d'expositions aux MP environnementaux aquacoles (cocktail HDPE, PP et PVC ; 138 μm).

La technologie valvométrique, déjà utilisée dans des études précédentes (Tran *et al.*, 2003 ; Chambon *et al.*, 2007 ; Castrec *et al.*, 2018), nous a permis d'identifier des anomalies du comportement valvaire, durant une exposition subchronique aux MP testés chez l'huître naissain. **Nos analyses ont montré, une augmentation des micro-fermetures (VMC) et un ralentissement de croissance à la suite d'une exposition aux MP de type HDPE. De plus, l'exposition des huîtres, *C. gigas* à un mélange de MP de type HDPE et de Chlortoluron, a révélé un retard de croissance ainsi qu'une augmentation de l'amplitude d'ouverture des valves.** Alors que les effets liés aux MP de type HDPE de 20-25 µm semblaient plutôt faibles chez les stades précoces de développement, les naissains d'huître creuse déclencheraient un signal de stress interne *via* l'augmentation des VMC (Guévelou *et al.*, 2013). Des résultats semblables ont été observés lors d'exposition à des microalgues toxiques (Tran *et al.*, 2015 ; Tran *et al.*, 2010). Un potentiel impact des MP sur le métabolisme énergétique liée à l'ingestion/égestion des microparticules, pourrait expliquer le retard de croissance observé dans notre étude. L'huître creuse n'aurait pas l'énergie suffisante pour croître dans des conditions optimales.

Dans les Pertuis Charentais, le Chlortoluron a été retrouvé à des concentrations maximales de 0,14 µg.L⁻¹. L'étude menée par Valiente-Moro *et al.* (2012) a montré des effets toxiques du Chlortoluron sur des microalgues aquatiques à une concentration de 50 µg.L⁻¹. Des concentrations élevées de pesticides ont été documentées dans les eaux de surfaces, avec par exemple 36 µg.L⁻¹ pour la Boscalid, sur les côtes californiennes (Smalling & Orlando, 2011 ; Qian *et al.*, 2018). De plus, des pics de contamination d'Atrazine allant jusqu'à 30 µg.L⁻¹ ont été décrits sur le bassin de l'Orgeval en 1999 (Guivarc'h-Blanchoud, 2001). Ainsi, afin d'être représentatif d'un pic de contamination en pesticide, en sortie de fleuve à proximité des zones conchylicoles, des concentrations fortes de 30 µg.L⁻¹ de pesticides ont été utilisées dans nos essais en laboratoire. Nos résultats ont montré que l'association du Chlortoluron avec les MP de type HDPE a conduit aussi à un retard de croissance important chez l'espèce marine testée. L'effet avéré du Chlortoluron (herbicide) sur les systèmes photosynthétiques du phytoplancton (Rutherford & Krieger-Liszkay, 2001 ; Valiente Moro *et al.*, 2012) pourrait avoir des effets sur les huîtres creuses, lors de l'alimentation par filtration des bivalves marins. De plus, le Chlortoluron pourrait potentiellement être adsorbé en surface des MP, dans le mélange de contaminants chimiques testé, et engendré une double toxicité dans les tissus d'accumulation des MP. Des études récentes ont permis de montrer que la vectorisation des pesticides sur les microparticules de PE (Wang *et al.*, 2020a ; Li *et al.*, 2021), influencent ainsi la persistance des pesticides dans l'eau, et la pénétration du pesticide par ingestion des MP. Ces mécanismes de vectorisation/libération des contaminants chimiques chez les animaux sont définis sous le nom de « Cheval de Troie » (Figure 45). Cependant, peu d'effets associant les pesticides adsorbés sur des MP ont été mentionnés (Horton *et al.*, 2018).

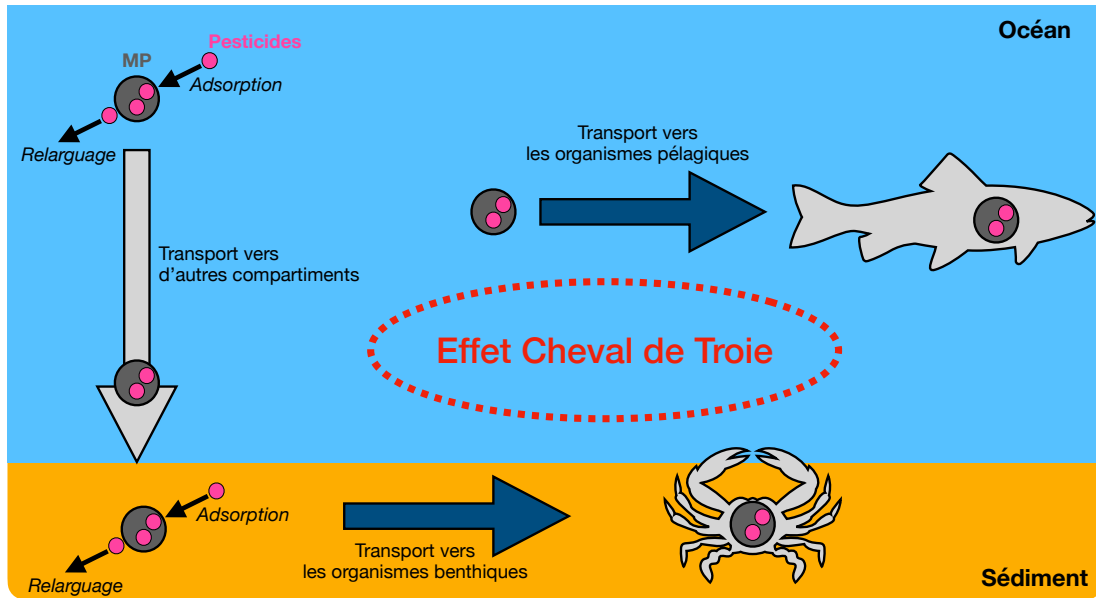


Figure 45. Interactions entre les MP et pesticides dans les environnements marins « Cheval de Troie ». Modifié d'après les travaux de Zhang *et al.* (2020b).

Malgré les problématiques majeures que ces contaminations chimiques peuvent poser, et malgré l'intérêt croissant développé à ce sujet, les impacts des MP sur les organismes sont encore peu documentés dans la littérature scientifique, et plusieurs études se focalisent sur de la contamination aux MP commerciaux (Desforges *et al.* 2014). Les MP retrouvés dans l'environnement sont susceptibles d'augmenter le transport et la biodisponibilité d'autres polluants organiques persistants (POP), bioaccumulables et toxiques (Gouin *et al.* 2011 ; Bayo *et al.*, 2018 ; Steinman *et al.*, 2020), mais aussi certains métaux (Wang *et al.*, 2020c ; Mao *et al.*, 2020). Au vu des études précédentes, il semble essentiel de s'intéresser aux sources de contaminations illustrant au mieux le contexte environnemental. Pour ce faire, des MP usagés/vieillis d'origine ostréicoles ont été testés sous forme de cocktail représentatif de l'exposome des bivalves marins dans les Pertuis Charentais, *i.e.* les zones ostréicoles. Dans ce contexte, les matériaux principalement utilisés par les professionnels de la filière ostréicole ont été sélectionnés : poche de grossissement ostréicole (HDPE), coupelle de captage (PP) et tube de captage (PVC). Van Cauwenbergh & Janssen (2014) ont démontré que les huîtres creuses de la façade atlantique française ingèrent des MP que l'on retrouve dans leurs tissus. Sussarellu *et al.* (2016) ont démontré que l'ingestion de MP de PS provoque une altération des flux d'énergie, du métabolisme et de l'homéostasie des huîtres creuses, ayant pour conséquence une perte d'énergie dédiée à la fonction de reproduction. Ils ont également constaté des impacts sur la gamétogénèse avec une diminution de la quantité et de la qualité des gamètes produites. Même si les impacts des MP sur les bivalves tels que *C. gigas* sont mal connus, les études montrent cependant qu'ils ont des effets sur les adultes et en particulier la gamétogénèse.

Nos expérimentations sur huîtres adultes avaient pour objectif d'apporter des données sur les effets intergénérationnels des MP d'origine ostréicole. Les macroplastiques collectés sur le littoral atlantique (*cf.* Article 1, plage pilote d'Angoulins-sur-mer, sud-ouest, France), ont été broyés, afin d'être réduits à une taille microparticulaire. **Nos principaux résultats ont montré un effet potentiel des MP environnementaux sur la survie des huîtres creuses adultes. Par ailleurs, l'activité spécifique de l'enzyme Laccase est modulée dans ces conditions d'expérience, révélant un effet sur la réponse immunitaire des animaux testés. En revanche, aucun effet n'a été observé sur la croissance durant les deux mois d'exposition. Concernant le stade larvaire, des effets significatifs ont été observés**

sur le comportement natatoire, le développement et la croissance, indiquant un effet intergénérationnel des MP.

Les effets intergénérationnels ont été documentés chez les nématodes exposés à des particules de NP de PS à des concentrations supérieures à 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Zhao *et al.*, 2017). La toxicité pourrait être principalement due à la translocation des particules de NP de PS dans les organes reproducteurs qui à leur tour ont été transmises à la descendance. Par ailleurs, Pitt *et al.* (2018) ont rapporté que les NP de PS, d'une taille de 42 nm pouvaient être transférés par la mère à la progéniture *via* une accumulation dans les œufs de poisson zèbre préalablement exposés (*Danio rerio*) et modifier les activités enzymatiques antioxydantes de la progéniture et des parents. Des médakas marin (*Oryzias melastigma*) ont montré des taux de fertilité et des taux d'éclosions diminués chez les descendants issus de parents exposés à 20 mg.L^{-1} de MP de PS (Wang *et al.*, 2019). Les MP ont des effets importants sur la survie et la fécondité de la progéniture F1 chez les bivalves, les copépodes, les daphnies et les populations de zooplancton (Yu *et al.*, 2020b). Chez le copépode *Tigriopus japonicus*, l'exposition à 25 mg.L^{-1} de MP de PS de 0,5 μm , a significativement réduit la survie de la génération F1 à 35 %, mais pas celle de la génération F0 - survie supérieure à 80 % (Lee *et al.*, 2013). L'exposition à des MP de PET (< 11 μm ; 14,44 mg.L^{-1}) a réduit de manière significative la taille de la population du copépode *Parvocalanus crassirostris*, d'environ 40 % par rapport aux témoins, après 24 jours d'exposition (Heindler *et al.*, 2017). Ces résultats suggèrent que l'exposition aux MP pourrait avoir des effets sur la fécondité des parents en réduisant la qualité des gamètes ainsi que le succès de fécondation ; mais aussi des effets intergénérationnels avec des effets sur la progéniture (*e.g.* le comportement de déplacement, le développement, la croissance). Fragilisés par les paramètres environnementaux changeants, les générations d'huîtres creuses pourraient aussi être affectées par des effets intergénérationnels dès le développement embryonnaire.

C. La pollution plastique des Pertuis Charentais encore mal connue

La société humaine génère quotidiennement une quantité considérable de déchets solides. De nombreux objets en plastique utilisés quotidiennement par les citoyens sont à usage unique et donc jetables. En tant que tels, les plastiques sont une composante majeure des déchets et des quantités substantielles s'accumulent maintenant sous forme de macro et microplastiques dans le milieu marin (Jambeck *et al.*, 2015). On estime que 75 % de tous les déchets marins sont en plastique et ces débris s'accumulent sur les plages (Nelms *et al.*, 2019), sur les rives des îles les plus reculées (Barnes, 2005), à la surface de la mer (Law *et al.*, 2010) mais aussi dans les profondeurs (Woodall *et al.*, 2014 ; Bergmann & Klages, 2012). On retrouve aussi beaucoup de déchets sur les berges, dans le lit des rivières et des fleuves mais également sur le plateau continental. Du fait de ce contexte particulièrement inquiétant, il devient urgent de caractériser et quantifier les pollutions plastiques sur les zones côtières marines, fortement utilisés pour l'aquaculture, la pêche et autres activités économiques. Les Pertuis Charentais regroupent beaucoup d'activités professionnelles et extraprofessionnelles reliés aux territoires marins et littoraux.

Tandis que ce manuscrit de thèse s'est principalement intéressé aux effets des MP sur le modèle d'étude *C. gigas*, une étude préliminaire a tout de même été effectuée sur un site littoral pilote (*cf.* Article 1, plage d'Angoulins-sur-mer, sud-ouest, France), exposé aux activités ostréicoles et touristiques. Cette étude pilote, complétée par les résultats du volet environnemental du projet

AQUAECOs (Lerebours, 2021 ; cf. Annexe 2), a permis de déterminer les concentrations en macro et MP dans plusieurs matrices et compartiments (Figure 46).

Tout d’abord, nos résultats ont montré que 70 % des macroplastiques collectés sur la frange littorale sableuse (plage pilote) était d’origine aquacole. Par ailleurs, les concentrations en MP, dans les sables de plage, vont de 397 (sédiment de surface) à 457 MP.kg⁻¹ (sédiment sur 5 cm de profondeur). En comparaison avec d’autres études menées sur les côtes françaises, nos résultats semblent cohérents. En effet, des études antérieures (en Mer Méditerranée) ont documenté des concentrations dans les sédiments côtiers peu profonds, de 101-897 MP.kg⁻¹ (60 % de filaments ; Alomar *et al.*, 2016) et dans les sédiments de plage, de 12-798 MP.kg⁻¹ (majorité de fibres de PP, PE et PS ; Constant *et al.*, 2019). Une étude a travaillé sur le secteur côtier de la Manche et a observé des concentrations en MP de 481 MP.kg⁻¹, dans le sédiment peu profond (majorité de particules sphériques ; Maes *et al.*, 2017). En ce qui concerne les concentrations en MP, dans les sédiments marins et l’eau de mer, proches des zones ostréicoles, elles sont respectivement de 300 à 1 500 MP.kg⁻¹ et 0,03 à 0,06 MP.L⁻¹ (Figure 46). Les concentrations dans le sédiment marin semblent légèrement plus importantes que dans le sédiment de plage.

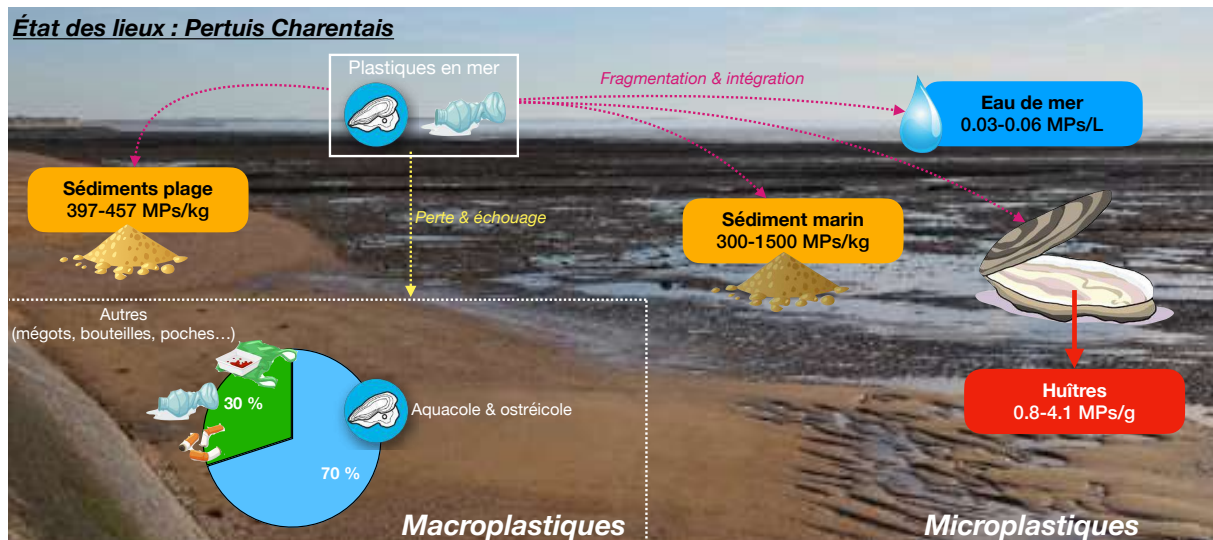


Figure 46. Récapitulatif des résultats AQUAECOs (volet expérimental et environnemental) sur la contamination plastique d’un site des Pertuis Charentais (sud-ouest, Atlantique, France). Détermination des concentrations en MP dans le sédiment sableux de plage, le sédiment marin, l’eau de mer et le biote (huîtres creuses). Complété d’après les travaux de Lerebours (2021). Photographie de fond réalisée lors d’une campagne de prélèvement (© Arno Bringer).

En comparaison avec des études précédentes, les quantités de MP retrouvés dans les eaux marines des Pertuis Charentais semblent assez faibles. Les travaux de Luo *et al.* (2019) ont montré des abondances en MP de 0,9 MP/L à 2,4 MP/L dans différents plans d'eau, des ruisseaux urbains et zones côtières de l’est de la Chine. De plus, l'abondance des MP est nettement inférieure à celle enregistrée dans les eaux marines côtières allemandes (88±82 fibres/L et 64±194 granules/L) où les fibres textiles semblaient dominantes (> 50 % ; Dubaish & Liebezeit, 2013). En comparaison avec les concentrations massiques utilisées dans nos expérimentations, certaines zones géographiques présentent des concentrations fortes. Dans la zone de l’Atlantique Nord-Ouest, Cózar *et al.* (2014) ont montré des concentrations en MP allant de 0 à 0,5 mg/L. En mer du Nord, Lorenz *et al.* (2019) ont démontré des concentrations maximales de 1,2 mg/L de MP. Sur la façade atlantique nord, des concentrations plus

faibles ont été enregistrées, de l'ordre de 0,02 mg/L (Lusher *et al.*, 2014). Des concentrations inquiétantes ont, par ailleurs, été mesurées sur les côtes californiennes, avec 5,3 mg/L de MP (Gilfillan *et al.*, 2009). Au vu de nos gammes de concentrations testées, allant de 0 à 10 mg MP.L⁻¹, nous pouvons tout de même constater que certaines zones géographiques pourraient être soumises à ces concentrations, démontrant des effets toxiques significatifs sur l'huître creuse, *C. gigas*. Cependant, ces propos restent hypothétiques, du fait de l'hétérogénéité des classes de tailles dans les précédentes études comparatives.

Par ailleurs, les travaux de Frias *et al.*, 2016 ont permis de détecter des concentrations allant de 0 à 262,8 MP/kg dans les sédiments marins subtidiaux, prélevés en zones côtières au Portugal. Ces concentrations sont légèrement plus faibles que celles mesurées dans les sédiments marins des Pertuis Charentais. De plus, des concentrations < 240 MP/kg de sédiment ont été retrouvées dans les eaux de la Mer de Bohai et de la Mer Jaune, en Chine (Zhao *et al.*, 2018). Les Pertuis Charentais pourraient représenter un site contaminé par les MP au niveau de la matrice sédimentaire marine, potentiellement dû aux mouvements de marées et à l'hydrodynamisme de la façade atlantique.

Les sources des plastiques, retrouvés sur les plages, sont diverses : des navires et bateaux commerciaux et de plaisance, les activités de pêche et d'aquaculture (*e.g.* corde, déchets, engins de pêche, filets) aux sources terrestres, rejets urbains, emballage (y compris les sacs en plastique), bâches en plastique et les déchets de production (Isensee & Valdes, 2015). L'étude menée par Xue *et al.* (2020), a montré que jusqu'à 62 % des MP dans les sédiments de surface proviennent de l'abrasion des engins de pêche. Les résultats de l'étude de Chen *et al.* (2018) indiquent que l'activité maricole peut être une source importante de MP, avec 56 % des MP retrouvés dans l'eau de surface (Baie de Xiangshan, Chine). Au niveau d'un site aquacole en Baie de Xiangshan, qui est exploité de manière intensive depuis des décennies en Chine, les images de télédétection par satellite ont révélé que les activités d'aquaculture étaient associées à une forte pollution MP dans les sédiments (Wu *et al.*, 2020). Ces résultats antérieurs semblent confirmer l'importance et l'abondance des déchets et MP d'origine aquacole sur les plages et dans les sédiments de ces écosystèmes aquacoles marins.

Le volet environnemental du projet AQUAECOs, a documenté des concentrations de **0,8 à 4,1 MP.g⁻¹ (poids humide) dans les tissus d'huîtres creuses** à proximité des zones de production ostréicole des Pertuis Charentais. En comparaison, notre étude expérimentale menée en laboratoire portant sur l'exposition d'huîtres creuses pendant 2 mois aux MP ostréicoles, a révélé des concentrations de 2,1 à 6,3 MP/g de tissus (observations microscopiques), à la plus faible concentration testée (0,1 mg/L). Ces résultats sont comparables aux concentrations maximales retrouvées dans l'environnement des Pertuis Charentais. Des études précédentes nous montrent des résultats hétérogènes en fonction des sites d'études. L'étude de Teng *et al.* (2019) a permis de décrire des concentrations de 0,6 MP/g de tissus d'huîtres prélevées sur les zones côtières chinoises. Des travaux ont permis de déterminer des concentrations de 3,8 MP/g dans les tissus d'huîtres creuses échantillonnés, dans un lagon fermé de Floride (Waite *et al.*, 2018). Cependant, beaucoup d'études ont mentionné le fait qu'une surestimation des quantités de MP retrouvées dans les échantillons expérimentaux et environnementaux, était possible (Alimi *et al.*, 2020 ; Tong *et al.*, 2020 ; Prata *et al.*, 2021). De ce fait, des biais seraient alors présents dans les comparaisons suggérées.

Une question majeure se pose alors : **quelle représentativité peut-il y avoir entre les concentrations en MP testées en condition de laboratoire et les concentrations décrites dans l'environnement marin des Pertuis Charentais ?**

Des données de concentrations environnementales en MP ont été collectées dans le cadre de l'étude préliminaire et grâce au volet environnemental du projet AQUAECOs (*cf.* Annexe 2). A défaut de pouvoir se targuer d'être représentatif de l'environnement et dans l'attente de données nouvelles sur les quantités de MP/NP dans les océans, la réalisation d'expériences en dose-réponse permet *a minima* d'identifier des seuils au-delà desquels des phénomènes de toxicité sont démontrés. Ces données sont précieuses et pertinentes pour la communauté scientifique mais aussi les gestionnaires et acteurs locaux (Parc Naturel Marin notamment), au regard des scénarii futurs de contamination des écosystèmes par les MP.

En utilisant les méthodes de calcul et conversion massique étudiées dans les travaux de Yu *et al.* (2020a) et Dris *et al.* (2016), nous avons pu obtenir une approximation de comparaison entre les volets : expérimental *vs* environnemental. Les concentrations détectées dans l'environnement marin des Pertuis Charentais sont de 0,03 à 0,06 MP.L⁻¹. En prenant la concentration maximale détectée et en supposant que tous les MP détectés sont du HDPE de taille comprise entre 4 et 25 µm, la concentration massique serait de 0,0007 mg.L⁻¹, dans le milieu naturel. Les MP de type HDPE (4-6 ; 11-13 et 20-25 µm) commerciaux testés en conditions expérimentales à 0,1 ; 1 et 10 mg.L⁻¹, pour le test embryo-larvaire, ont une densité moyenne de 0,97 (4-6 µm MPP-635 XF, 11-13 µm MPP-635 G and 20-25 µm MPP-1241, TMMicropowders Inc. USA). Dans notre étude expérimentale, une concentration 143 fois plus forte (0,1 mg.L⁻¹) que celle retrouvée en milieu marin des Pertuis Charentais a été testée sur l'huître creuse. Cependant, lors de l'exposition de 24 jours, des huîtres naissains, à 0,01 mg.L⁻¹ (10 µg.L⁻¹) de MP HDPE (20-25 µm), nous pouvons hypothétiquement considérer que la concentration testée est représentative de l'environnement naturel des Pertuis Charentais futur, avec une concentration testée 14 fois plus forte que ce qui se retrouve aujourd'hui dans le milieu naturel. La Figure A2 (*cf.* Annexe 4) récapitule les calculs utilisés pour les conversions massiques entre volet expérimental *versus* volet environnemental du projet AQUAECOs.

La demande et la production en plastique pourrait encore augmenter dans le futur (Lebreton & Andrady, 2019) et automatiquement la quantité de déchets rejetés dans les océans pourrait s'accroître d'ici 2025 (Jambeck *et al.*, 2015). De ce fait, les concentrations en MP devraient s'accroître également dans les milieux marins et notamment dans les écosystèmes littoraux, avec l'accroissement du tourisme de masse et la délocalisation des populations sur les côtes françaises, proches des littoraux. En 2100, de 9,6 à 48,8 items/m³ devraient flotter dans l'océan, ce qui représente une augmentation de 50 fois, comparée aux concentrations actuelles (Everaert *et al.*, 2018). L'océan est le réceptacle ultime des sources de MP terrestres ; par conséquent, la plupart des études se sont focalisées sur les MP en milieu aquatique, depuis quelques années. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour révéler les mécanismes de toxicité des MP, les processus d'adsorption/désorption par lesquels les polluants environnementaux s'attachent et se détachent des MP, et leur toxicité combinée (Chen *et al.*, 2021). De plus, les données expérimentales n'ont pas encore confirmé que les MP ont un impact négatif sur la santé humaine, même si des études *in vitro* ont montré que les MP peuvent nuire à la santé humaine en induisant un stress oxydatif, une cytotoxicité et une inflammation (Yong *et al.*, 2020). La consommation de produits issus de l'aquaculture, est une source importante de MP chez l'homme (Lusher *et al.*, 2017 ; Waring *et al.*, 2018).

D. Les enjeux environnementaux et sociétaux : conchyliculture et contaminants

1. Les enjeux liés aux microplastiques

L'industrie du plastique a grandement influencé le développement de la pêche et de l'aquaculture. Les techniques aquacoles ont progressé avec la fabrication industrielle de plastiques et les équipements sont maintenant principalement fabriqués à partir de matériaux synthétiques ou semi-synthétiques en HDPE, PP, PVC et PLA (Lusher *et al.*, 2017) ; les poches et les collecteurs pour bivalves sont généralement en plastique (Andrefouët *et al.*, 2014). Alors que la population mondiale continue de croître (*i.e.* estimation de 9,7 milliards en 2050 ; Nations-Unies, 2021), la demande en fruits de mer et poissons a augmenté proportionnellement (Lusher *et al.*, 2017). L'aquaculture a été développée pour répondre à la demande des consommateurs de poissons, crustacés et bivalves, et les méthodes de production ont continué à se développer pour répondre à la demande du marché. La production française conchylicole a atteint 135 000 tonnes de poids vif, avec une valeur de première vente estimée à 551 millions d'euros en 2017 (FranceAgrimer, 2020). À travers ces chiffres, l'espèce huître creuse, correspond à 81 000 tonnes vendues pour un total de 402 millions d'euros (FranceAgrimer, 2020). Malgré une perte économique majeure durant la période de la crise sanitaire liée à la COVID-19, la région Nouvelle-Aquitaine reste le producteur conchylicole leader sur le secteur national.

Du fait d'une croissance majeure de productivité conchylicole, les matériaux plastiques utilisés sont de plus en plus nombreux. Nos résultats ne permettent pas de confirmer que les plastiques utilisés en conchyliculture se fragmentent rapidement dans l'environnement et dans le temps, et accroissent les concentrations de MP dans les milieux marins. Il y a eu une augmentation significative des concentrations de particules MP dans les eaux de surface des océans au cours des quatre dernières décennies et les préoccupations concernant l'impact potentiel sur l'environnement marin ont augmenté au cours des dernières années (Auta *et al.*, 2017). Les préoccupations se sont positionnées sur les écoulements d'eaux usées et eaux de ruissellement, la fragmentation des macroplastiques (MP secondaires) ainsi que le déversement des MP industrielles (primaires) dans les écosystèmes, par exemple.

Les MP sont des contaminants nuisibles et persistants dans les milieux aquatiques et de plus en plus abondants dans les écosystèmes marins, et notamment les zones aquacoles (Ma *et al.*, 2020). Les mesures préventives, visant à atténuer leurs ruissellements dans l'environnement, doivent donc être encouragées par une meilleure gestion des déchets et des eaux usées. Pour ce faire, des méthodes d'élimination des MP dans le traitement de l'eau potable et le traitement des eaux pluviales urbaines pourraient améliorer significativement la qualité des eaux douces et marines notamment celles utilisées pour l'aquaculture (Pankkonen, 2020 ; Shen *et al.*, 2020 ; Wang *et al.*, 2020e).

La recherche, sur les effets de l'exposition aux MP, s'est concentrée sur des réponses physiologiques ou biologiques spécifiques. Nous savons que les organismes marins sont exposés à de multiples facteurs de stress dans leur environnement avec des effets additifs ou synergiques potentiels (Noyes & Lema, 2015 ; DeCourten *et al.*, 2019, Dong *et al.*, 2020). Pourtant, la façon dont les MP interagissent avec d'autres facteurs de stress environnementaux tels que l'hypoxie, l'augmentation de la température des océans et l'acidification des océans n'a pas été véritablement étudiée. De plus, il existe plusieurs formes de MP (microparticules, microbilles, microfibrilles) pouvant entraîner des effets toxiques chez

les bivalves, comme une perturbation des taux de filtration, des changements dans l'alimentation, une fécondité réduite, des dommages à l'ADN et une neurotoxicité (Green, 2016 ; Sussarellu *et al.*, 2016 ; Ribeiro *et al.*, 2017 ; Woods *et al.*, 2018). Malgré le fait que nos travaux se soient basés uniquement sur les MP de type microbilles/microparticules et fragments, nos résultats sont en adéquation avec ces travaux précédents, montrant des effets complémentaires sur le comportement, le développement et la croissance des stades de vie précoces et tardifs. Les effets des MP sur la génération larvaire, issue de parents exposés, ont montré des modes d'actions complexes à explorer, afin de mieux comprendre le transport des MP/NP d'une génération à l'autre *via* les gonades.

Malgré des efforts récents pour quantifier leurs présences dans les plans d'eau et le biote aquatique, les données sont encore rares. De plus, le fait que les méthodes actuelles peinent à quantifier les particules MP plus petites et les NP, constitue un défi majeur dans les années à venir, d'autant plus que ces particules fines sont les plus susceptibles d'être absorbées par les bivalves et potentiellement par l'Homme (Sharma & Chatterjee, 2017 ; Cox *et al.*, 2019 ; Mercogliano *et al.*, 2021 ; Figure 47), compromettant la sécurité alimentaire (Vázquez-Rowe *et al.*, 2021). Une précédente étude a estimé que l'ingestion de MP par l'Homme par la consommation de crustacés était d'environ 13±58 particules MP par an (Daniel *et al.*, 2021).

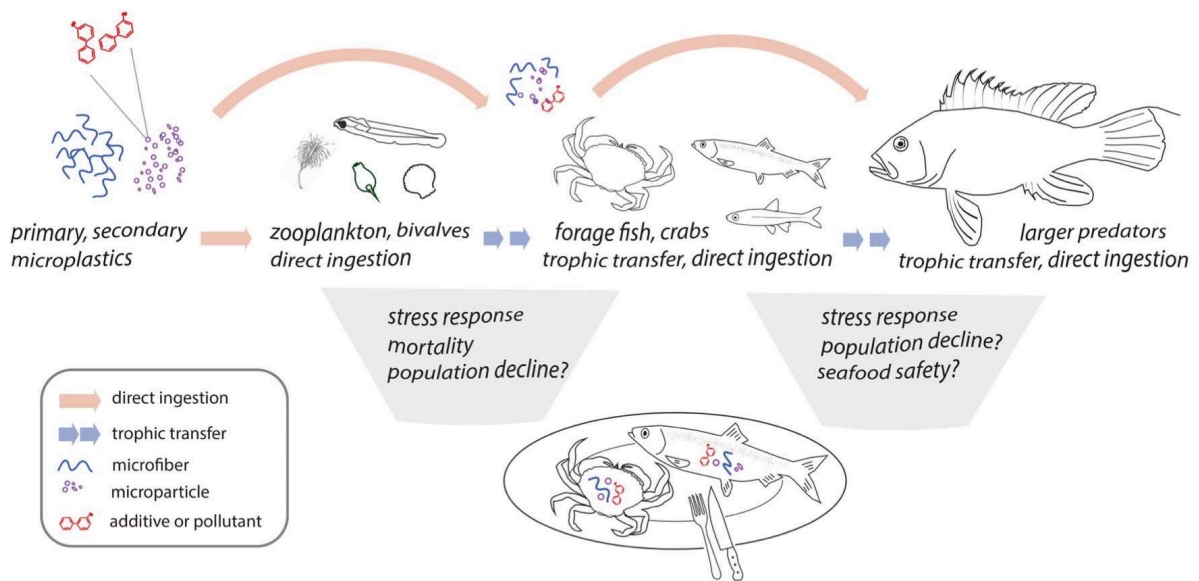


Figure 47. Ingestion de MP par transfert trophique, de l’huître creuse jusqu’à l’Homme. D’après les travaux de Baechler *et al.* (2020).

Une des préoccupations concernant l'ingestion de MP par les espèces de bivalves, est la bioamplification *via* le réseau trophique, des potentiels POP vectorisés à la surface des MP (Derraik, 2002 ; Moore, 2008 ; Teuten *et al.*, 2009). La biodisponibilité des MP/NP et des contaminants associés dans les tissus d'espèces commerciales produites et vendues pour la consommation humaine peut présenter un risque pour la santé des consommateurs humains (Baechler *et al.*, 2020). La plupart des études examinant l'écotoxicologie des MP utilisent des polymères commerciaux (Tallec, 2019), plutôt que des MP environnementaux ayant vieillis dans l'environnement marin et potentiellement intégrés à leurs surfaces par des POP. En effet, certains composés chimiques (*e.g.* PBDE, phtalates, nonylphénols, bisphénol A et autres antioxydants) sont incorporés dans les plastiques au moment de leur fabrication. Ils peuvent ensuite être lessivés/lixiviés car la plupart d'entre eux ne sont pas liés

chimiquement au polymère (Suhrhoﬀ & Scholz-Böttcher, 2016). La lixiviation et la dégradation des plastifiants et des polymères sont des phénomènes complexes qui dépendent des conditions environnementales de la décharge et des propriétés chimiques de chaque additif (Teuten *et al.*, 2009). En raison de l'accumulation et de la fragmentation du plastique dans les océans, les additifs plastiques pourraient représenter un risque écotoxicologique croissant pour les organismes marins (Hermabessiere *et al.*, 2017). De plus, dans l'environnement, les bivalves subissent une exposition prolongée aux MP et à l'ensemble des produits chimiques toxiques associés, mais la grande majorité des expositions expérimentales sont de courte durée. Effectivement, nos principaux résultats ont pu démontrer des effets toxiques importants lors d'expositions courtes (24 h) sur des stades précoces de développement, à des concentrations relativement fortes et avec des polymères commerciaux. Cependant l'utilisation, de cocktails environnementaux, s'est révélée toxique pour les bivalves, avec des effets significatifs sur des expositions plus longues (2 mois). Il serait pertinent pour l'avenir de réaliser des expositions longues sur les stades précoces de développement.

Indépendamment des changements que cela peut générer dans la perception des consommateurs concernant l'ingestion de MP, la prochaine décennie sera cruciale d'un point de vue scientifique et politique. Pour les premiers, des données et des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les niveaux d'expositions et les dommages potentiels que ces polluants exercent sur la qualité des écosystèmes et la santé humaine. Des politiques efficaces visant à minimiser le rejet de déchets plastiques dans l'océan doivent être adoptées dans le monde entier, afin d'assurer, entre autres, la pérennité des écosystèmes mais aussi des activités professionnelles dans les zones côtières.

Un autre défi est l'omniprésence des MP dans l'environnement, qui nécessite un protocole d'échantillonnage cohérent et strict sur le terrain et en laboratoire pour éviter la contamination par les MP/ NP présents dans l'air ou rejetés par les vêtements (Scopetani *et al.*, 2020). La communauté scientifique est consciente du besoin pressant de normaliser les protocoles d'isolement et d'analyse des MP pour permettre des comparaisons entre études et établir des niveaux de base de la contamination MP.

Au vu des pressions exercées par la croissance accrue des pollutions plastiques et MP, le secteur de la conchyliculture se doit de participer et de s'engager dans des projets novateurs afin de limiter cette contamination. Des équipements en plastique biodégradables ont été proposés pour une utilisation en aquaculture en remplacement des plastiques pétrochimiques (Schoof & DeNike, 2017). Le GESAMP (2010), citant une étude réalisée en 2007 par le California Integrated Waste Management Board (2007), rapporte que les plastiques biodégradables selon la norme applicable de l'Organisation internationale de normalisation (ISO 14855-1 : 2005) ne sont pas susceptibles de se dégrader correctement dans l'océan. Au niveau des Pertuis Charentais, des coupelles de fixation biodégradables en résidus végétaux et microbrissures de coquille (SEABIRD, Lorient, France) sont en phase d'expérimentation sur plusieurs secteurs ostréicoles. Des suivis sont réalisés depuis 2 ans afin de déterminer la solidité et l'efficacité de ces nouveaux composants. Cependant aucune études environnementales et toxicologiques n'ont été menées pour tester ces plastiques nouvelles générations dans des conditions expérimentales.

D'autre part, l'utilisation de fibres naturelles (*e.g.* fibres de bananier) pour renforcer les pièces en plastique permet de réduire les produits synthétiques et rend possible la substitution de produits à fort impact environnemental par d'autres avec un impact et un coût inférieur (Paz *et al.*, 2020). De plus, les mélanges de plastiques biodégradables (PLA, PCL...) nécessitent une gestion post-consommation des déchets, car leur rejet dans l'environnement peut provoquer une pollution plastique (Narancic *et al.*,

2018). Cela confirme qu'une gestion approfondie et un programme de suivi des plastiques utilisés en aquaculture sont essentiels afin de garantir une bonne qualité des eaux marines. Actuellement, les bioplastiques représentent environ 0,5 % des quelque 335 millions de tonnes de plastique produites annuellement (European Bioplastics, 2020).

Par ailleurs, les tables ostréicoles en ferraille, qui rejettent des métaux traces dans l'environnement proche des zones conchylicoles, sont toxiques pour les stades précoces de développement (Geffard *et al.*, 2007 ; Mai *et al.*, 2012). Une étude antérieure, à tester l'utilisation de l'EDDS (Acide éthylènediamine-N, N'-disuccinique) pour les applications en éclosion aquacole et montre que l'EDDS est une alternative biodégradable efficace à l'EDTA qui permet d'atténuer les effets des métaux traces pour l'élevage larvaire des mollusques (McDougall *et al.*, 2020). Cette technique pourrait aussi être utilisée sur les tables ostréicoles en milieu naturel pour atténuer les effets toxiques des métaux.

La réduction et une meilleure gestion des déchets plastiques à la source (Steenstaad *et al.*, 2017 ; European Parliament, 2015), le traitement des eaux usées par membranes filtrantes (Lares *et al.*, 2018 ; Michielssen *et al.*, 2016) et l'utilisation de plastiques biosourcés/biodégradables (Paço *et al.*, 2019) permettraient de limiter la concentration de MP dans les eaux marines (Pico & Barcelo, 2019). De plus, la mise en place d'actions collaboratives et d'études scientifiques aident les professionnels maritimes (comme les conchyliculteurs) à mieux comprendre les enjeux liés à l'environnement, et les encouragent à mettre en place des programmes et plans de gestion qui concourent à la réduction des matériaux plastiques.

2. Les enjeux liés aux pesticides

Les molécules issues de produits phytosanitaires (*i.e.* molécules mères et tous leurs produits de dégradation) perturbent les hydrosystèmes et ont des effets indésirables sur la biodiversité ainsi que la santé humaine (Bernard, 2017). Les questionnements et préoccupations de la société ont évolué avec le temps, mêlant, préoccupations environnementales et préoccupations vis-à-vis de la santé (Rostagno *et al.*, 1999 ; Dabrin, 2009). Les pesticides sont de plus en plus évoqués dans les médias et font écho à des épisodes de pollution ou controverses sur les maladies professionnelles (*e.g.* Monsanto en 2007). L'utilisation des pesticides s'est fortement accentuée avec le développement d'une agriculture productiviste et intensive et leurs utilisations massives ne sont pas sans conséquences. Les quantités de substances actives vendues en 2018 étaient de 85 876 tonnes (+ 21 % par rapport à 2017, Ecophyto, 2019). La part des produits phytosanitaires appliqués n'atteignant pas leur cible, donc directement transférée dans l'air et/ou le sol, est extrêmement variable (de 10 à 90 %) selon les stades de la culture et les conditions d'application (Butault *et al.*, 2011).

En dehors des activités agricoles, les herbicides sont utilisés, en quantité plus faible, dans les jardins, les zones urbanisées ou sur les routes et voies ferrées.

De ce fait, les organismes présents en sortie d'estuaires, fleuves et rivières se retrouvent impactés par les rejets de pesticides. C'est le cas des zones conchylicoles qui reçoivent en concentrations fortes, les mélanges cocktails de pesticides utilisés par les activités agricoles. Dans les cultures conchylicoles, tout le cycle de vie, repose sur la qualité de l'environnement naturel (Chaillou, 2018).

Au niveau des Pertuis Charentais, les apports de pesticides sont drainés d'une part par les fleuves locaux (*i.e.* Lay, Sèvre Niortaise, Curé, Charente, Seudre et leurs affluents), et d'autre part par des fleuves plus éloignées, estuaire de la Gironde notamment. Dans le bassin de Marennes-Oléron, les

herbicides représentent 75 % du volume total des produits phytosanitaires et les apports sont essentiellement printaniers (avril- juin ; Munaron, 2004).

Dans les milieux naturels en zone littorale du bassin de Marennes-Oléron, les résidus de produits phytosanitaires, résultant du traitement des cultures, constituent un danger pour la conchyliculture (Arzul & Quiniou, 2014). Le suivi, des concentrations en pesticides, révèle principalement la présence d'herbicides (Atrazine, Diuron, Isoproturon, Acétochlore), comme démontré dans l'étude précédente.

Les effets et la toxicité des pesticides ont été démontrés en conditions de laboratoire sur les bivalves. La complexité de leurs modes d'actions et des mélanges de molécules dans les écosystèmes côtiers naturels y rend l'investigation, *in situ*, très difficile. La plupart des connaissances acquises aujourd'hui relèvent de résultats obtenus en laboratoire essentiellement, sur le phytoplancton et sur des larves de bivalves (huîtres et moules) (Gagnaire *et al.*, 2007 ; Stachowski-Haberkorn, 2008 ; Mai *et al.*, 2012 ; Mai *et al.*, 2013 ; Mottier *et al.*, 2013). La connaissance de leurs impacts dans les Pertuis Charentais, au niveau des zones conchylicoles, relève donc pour l'instant plus d'hypothèses que de certitudes (Soletchnik *et al.*, 2015). Les données récentes obtenues sur les concentrations en pesticides dans les Pertuis Charentais, révèlent des concentrations comprises entre 0,001 et 0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$, entre 2018 et 2020 (Action program, 2018-2020), pour les molécules telles que le Glyphosate, Isoproturon, Chlortoluron, Boscalid... Certaines études antérieures ont pu observer des effets des pesticides sur les stades précoces chez l'huître, *C. gigas*. Dans l'étude menée par Mai *et al.* (2012), les herbicides (Irgarol, Métolachlore) ont montré des effets à 0,01 $\mu\text{g.L}^{-1}$ sur le développement et les dommages à l'ADN. Des effets, suite à une exposition à un cocktail de 14 pesticides, ont été observés à 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ sur le développements et l'intégrité de l'ADN des jeunes stades de vie chez l'huître creuse (Mai *et al.*, 2020). L'étude récente de Kuchovská *et al.* (2020), montre des effets sur le comportement natatoire, de larves-D de *C. gigas*, entre 0,02 et 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Imidacloprid, Propiconazole, Nanopropiconazole). Ces études démontrent des effets toxiques à de faibles concentrations sur des paramètres importants chez l'huître, tout comme notre étude l'a montré sur des molécules pesticides (herbicide et fongicide) relatif à la contamination des Pertuis Charentais. En outre, il a été démontré que certains pesticides peuvent agir comme additif, et de manière synergique, sur les organismes aquatiques (Deneer, 2000 ; Belden *et al.*, 2007 ; Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2008 ; Nørgaard & Cedergreen, 2010).

Il a été démontré que les pesticides contribuent au déclin des organismes non ciblés, tels que les abeilles, les oiseaux et les espèces aquatiques (Beketov *et al.*, 2013 ; Rundlöf *et al.*, 2015 ; Hallmann *et al.*, 2014), concourant à la réduction de la biodiversité. Cela va à l'encontre des efforts mondiaux de protection de la biodiversité et, en particulier, des objectifs de la réglementation de l'UE sur les pesticides (Parliament, 2009). Les dépassements constants des seuils réglementaires (Stehle & Schulz, 2015 ; Schäfer *et al.*, 2019) et les révisions des autorisations de pesticides, tels que les néonicotinoïdes dans l'UE, attestent de lacunes en matière de réglementation et usages des pesticides. La réglementation des pesticides devrait être basée sur des preuves scientifiques solides et actualisées, selon lesquelles les produits présentant des effets inacceptables sur l'environnement ne seraient pas acceptés pour les utilisateurs (Sgolastra *et al.*, 2020). La biodépollution ou bioremédiation microbienne est l'utilisation d'organismes vivants, et plus particulièrement de micro-organismes (*e.g.* champignons, bactéries) ou de plantes, pour éliminer les polluants toxiques des différents milieux naturels. La bioremédiation microbienne a été proposée comme un moyen sûr et durable de décontaminer l'environnement des substances phytosanitaires présentes (Boudh & Singh, 2019). Un projet innovant (OTELHO) en phase d'expérimentation vise à développer un outil connecté afin d'orienter les décisions d'intervention des horticulteurs pour réduire l'usage des produits chimiques (Paris *et al.*, 2019).

Au cours des années 2000, différents rapports d'expertise (Momas *et al.*, 2004 ; Aubertot *et al.*, 2005) ont mis en évidence les effets délétères des pesticides sur la santé des utilisateurs et sur l'environnement. En 2008, la France lance le plan Ecophyto 2018 (Zahm, 2011). Associant plusieurs parties prenantes à sa mise en exécution (*e.g.* scientifiques, syndicats agricoles, entreprises productrices et distributrices de pesticides et associations), ce plan visait à réduire en 10 ans l'usage des pesticides en France de 50 %. Avec des moyens financiers importants engagés pour ce programme, le plan Ecophyto, est un échec. Ce plan a été très critiqué, notamment par la Fondation Nicolas Hulot qui a depuis sorti un rapport montrant une augmentation de 25 % de l'usage des pesticides en France en 10 ans (Fondation Nicolas Hulot, 2021). La nécessité de réflexions approfondies et des financements cohérents, sur le renouvellement des modalités de l'action publique, pour qu'elle réussisse à impulser des changements systémiques, doivent être mis à l'ordre du jour (Guichard *et al.*, 2017). La jeune génération est un levier majeur dans l'agriculture biologique grandissante. Un changement éthique important dans la gestion agricole et le respect de l'environnement est primordial. Cela permettra dans l'avenir d'enclencher un processus de transition agroécologique (Lamine *et al.*, 2010 ; De Bon *et al.*, 2018 ; Fosse *et al.*, 2019).

CHAPITRE VII - Conclusions & perspectives

Les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse montrent que les microplastiques (MP) impactent les jeunes stades de vie chez l'huître creuse (*C. gigas*), notamment durant le développement embryonnaire et les premiers jours de développement au stade larve-D. Les concentrations croissantes en MP dans les eaux côtières, proches des zones conchylicoles, représentent une menace majeure pour le maintien de l'activité aquacole ainsi que la qualité des eaux. Des atteintes physiologiques et comportementales ont été observées à divers stades de développement de l'huître creuse. Cependant il apparaît pertinent de mener des analyses complémentaires sur les effets des MP sur le métabolisme et les réserves énergétiques des huîtres, pour compléter cette étude et mieux comprendre les effets possibles des MP sur les mollusques bivalves marins. Afin de mieux comprendre l'interaction des MP/NP avec les membranes biologiques, les organites cellulaires, le développement, la croissance et le comportement des bivalves, des données obtenues en métabolomique et lipidomique seront analysées. Ces approches -omiques permettront d'étudier les métabolites potentiellement impactés par les particules de plastiques, et mettre en lien ces résultats avec les mesures de biomarqueurs réalisées sur les naissains d'huître creuse. De plus, il serait intéressant de mettre au point un protocole de production 'en grande quantité' de larves-D (à 24 h), afin d'effectuer des analyses de biomarqueurs de toxicité sur les stades précoces de développement chez les bivalves marins.

Depuis quelques années, les filières aquacoles et conchylicoles sont confrontées à un double défi : satisfaire la demande accrue tout en évitant les dérives sanitaires et écologiques/environnementales. Les matériaux plastiques utilisés en ostréiculture possèdent de nombreux atouts (*e.g.* légèreté, résistance, coût). Cependant les outils plastiques aquacoles devront être substitués par des matériaux écologiques, non toxiques pour l'environnement marin. Les plastiques utilisés en grande quantité doivent être limités afin d'éviter toute contamination directe des mollusques bivalves marins par les additifs ou les polymères plastiques (Figure 48). Par ailleurs, la fragmentation des macroplastiques en MP/NP est un fait avéré et d'autant plus dans les milieux marins sous l'action des UV et des phénomènes de frottements notamment. L'intérêt croissant des plastiques biosourcés et biodégradables semblent être une solution de remplacement intéressante à condition de s'assurer de leur innocuité par des tests écotoxicologiques en amont de leur mise sur le marché. Aujourd'hui, il existe peu d'informations dans la littérature sur le cycle de vie et la dégradabilité des plastiques aquacoles. En perspective, et dans le cadre d'une démarche expérimentale, nous proposons de nous intéresser aux comportements des plastiques utilisés en aquaculture. Ces résultats pourraient nous permettre de mieux gérer l'utilisation des plastiques d'origine pétrochimique, et de connaître leur durée de vie, sans fragmentation ou fragilisation, dans le milieu marin. Afin de compléter ces perspectives de travaux de thèse, nous souhaitons travailler sur la mise en place d'une « carte d'identité » toxicologique pour chaque plastique utilisé en aquaculture. Pour ce faire, les métaux ainsi que les POP, potentiellement adsorbés à la surface des plastiques aquacoles, pourront être quantifiés (*e.g.* phtalates, dioxines, HAP, PCB, pesticides). Ainsi, les plastiques d'origine ostréicoles pourront être caractérisés de manière précise sous leur forme primaire « neuf » et secondaire « vieillis dans l'environnement des Pertuis Charentais ». Des analyses sont d'ores et déjà en cours, en collaboration avec l'IPREM de l'Université de Pau, afin d'identifier les concentrations en métaux présents à la surface des plastiques aquacoles primaires vs secondaires.

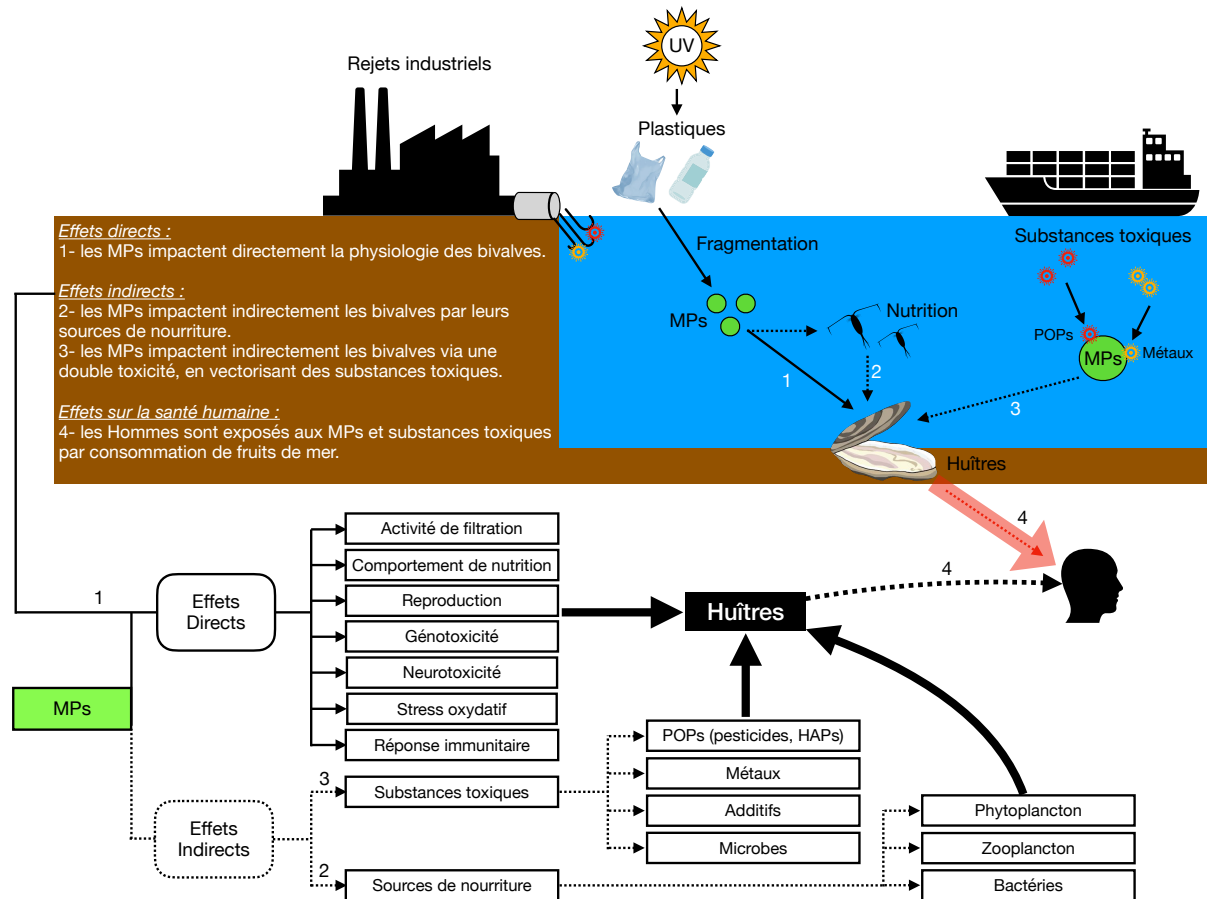


Figure 48. Schéma global de la contamination microplastiques dans le milieu marin sur les espèces de bivalves, telles que l'huître creuse (*C. gigas*). Modifié d'après Zhang *et al.* (2020a).

Dans le but de préconiser de nouvelles mesures de gestion et des actions précises pour les professionnels des filières aquacoles, les perspectives pourraient se porter sur la mise en place d'un « plan zéro plastiques aquacoles » afin d'améliorer, la communication des professionnels, les pratiques ostréicoles et participer au maintien d'une bonne qualité de l'eau. Ces travaux de thèse ont montré que les MP étaient facilement et rapidement ingérés par les huîtres creuses mais aussi excrétés *via* les fèces. Les temps de dépuration dans les bassins (dégorgeoirs) juste avant le processus de commercialisation, pourraient être augmentés afin de s'assurer d'une excrétion quasi-complète des microparticules plastiques et polluants associés potentiellement présents. En complément, un système de filtration pourrait être utilisé par les professionnels afin de réduire, les entrées de microparticules plastiques dans les bassins fermés. Des filtrations sur charbon actif pourraient aussi être employées pour réduire les concentrations en polluants organiques dans les eaux, potentiellement vectorisés sur les plastiques et source de toxicité additionnelle.

Aujourd'hui, il n'existe pas d'outils pratiques et prêts à l'emploi en écotoxicologie afin de diagnostiquer et prédire l'accumulation et les effets des substances chimiques sur les organismes vivants marins. De ce fait, des outils mathématiques et statistiques (application sur MosaicBioacc) pourraient être utilisés afin de modéliser le comportement et les effets des polluants dans le milieu. Ces optimisations pourraient être mises au point à travers nos résultats expérimentaux dans un premier temps, afin de mieux visualiser les effets significatifs (Ratier *et al.*, 2020). L'utilisation de la modélisation, d'outils de vulgarisation et d'aide à la visualisation des données, serait alors destinée à présenter les résultats aux acteurs socio-économiques et professionnels (*i.e.* filières aquacoles et conchylicoles).

Afin d'être le plus représentatif possible du milieu, nous préconisons de travailler sur des MP/NP primaires et secondaires représentatifs de l'environnement ou ayant vieillis dans le milieu, avec des concentrations proches de celles retrouvées aujourd'hui ou dans un futur proche sur le littoral charentais. Dans l'état de l'art de cette thèse, nous avons décrit de nombreux réseaux de surveillance environnementaux qui ont été créés (notamment sur les pesticides) pour définir un *bon état écologique* des eaux marines sur la frange atlantique française. Depuis quelques années, le descripteur 10 de la DC SMM s'intéresse aux propriétés et quantités de déchets marins pouvant avoir des effets sur l'environnement marin et côtier. Un des critères de définition du *bon état écologique* pour ce descripteur sont la composition, la quantité et la distribution spatiale des micro-déchets sur les côtes, à la surface, dans la colonne d'eau et sur les fonds marins (Gerigny *et al.*, 2017).

Les effets cocktails semblent aussi pertinents à prendre en compte, en associant différentes classes de polluants et/ou en associant les polluants chimiques et agents pathogènes. Par ailleurs, nos travaux ont permis de montrer des effets intergénérationnels, lors d'expositions d'huitre creuse adulte durant la période de gamétogénèse. Des suivis à long terme et des expositions sur plusieurs générations seraient intéressants pour connaître les voies de transferts et/ou les potentiels effets des contaminants chimiques.

Pour finir, l'interdisciplinarité pourrait être renforcée sur ces thématiques de recherche, afin de venir en appui aux disciplines biologiques et écotoxicologiques. Les démarches SHS (Sciences Humaines et Sociales) pourraient nous permettre d'échanger/dialoguer sur la perception de la qualité du milieu avec les utilisateurs et professionnels des zones conchylicoles, afin de mieux cibler nos expérimentations et analyses. Les démarches SHS/STS permettraient d'identifier des actions concrètes en coopérations visant à prendre en compte les impacts environnementaux et leur intégration dans les activités aquacoles des Pertuis Charentais.

Par ailleurs, l'ensemble de nos données et résultats a fait l'objet de communications scientifiques lors de congrès nationaux (*i.e.* Polymères et Océans, GDR EA) et internationaux (*i.e.* ISGC, SETAC, MICRO). Des rapports de synthèse ont été communiqués aux financeurs et partenaires du projet AQUAECOs et plusieurs articles scientifiques ont été publiés dans des revues internationales de rang A (*cf.* Annexe 1). Enfin, plusieurs présentations de résultats effectuées tout au long de cette thèse, ont permis d'informer et d'échanger avec les professionnels de la filière conchylicole (Comité Régional de la Conchyliculture Charente-Maritime) et les acteurs et gestionnaires de l'environnement (Parc Naturel Marin de l'estuaire de la Gironde & de la mer des Pertuis) et d'établir un dialogue pour une meilleure gestion environnemental du littoral des Pertuis Charentais.

RÉFÉRENCES

< A >

Action program, Coastal water quality in shellfish farming areas, 2018-2020. Qualyse & CD17, 2020. (accessed October 2020).

Adjagodo, A., Tchibozo, M. A. D., Kelome, N. C., & Lawani, R. (2016). Flux des polluants liés aux activités anthropiques, risques sur les ressources en eau de surface et la chaîne trophique à travers le monde : synthèse bibliographique. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(3), 1459-1472.

Agreste, 2005. Recensement de la conchyliculture 2001, Agreste Cahier n° 1, Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et de la ruralité, Service Central des Enquêtes et Etudes Statistiques, 89p.

Agreste, 2014. Recensement de la conchyliculture 2012. 160 000 tonnes de coquillages commercialisés 1-6. <http://agreste.agriculture.sg-ppd.maaf.ate.info/IMG/pdf/primeur316.pdf>

Akcha, F., Spagnol, C., & Rouxel, J. (2012). Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquatic Toxicology*, 106, 104-113.

Aksakal, F. I. (2020). Evaluation of boscalid toxicity on *Daphnia magna* by using antioxidant enzyme activities, the expression of genes related to antioxidant and detoxification systems, and life-history parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 237, 108830.

Alimba, C. G., & Faggio, C. (2019). Microplastics in the marine environment: Current trends in environmental pollution and mechanisms of toxicological profile. *Environmental toxicology and pharmacology*, 68, 61-74.

Alimi, O. S., Fadare, O. O., & Okoffo, E. D. (2020). Microplastics in African ecosystems: Current knowledge, abundance, associated contaminants, techniques, and research needs. *Science of The Total Environment*, 142422.

Al-Malaika, S., Axtell, F., Rathon, R., & Gilbert, M. (2017). Additives for plastics. In *Brydson's Plastics Materials* (pp. 127-168). Butterworth-Heinemann.

Alomar, C., Estarellas, F., & Deudero, S. (2016). Microplastics in the Mediterranean Sea: deposition in coastal shallow sediments, spatial variation and preferential grain size. *Marine environmental research*, 115, 1-10.

Amélineau, F., Bonnet, D., Heitz, O., Mortreux, V., Harding, A. M., Karnovsky, N., Walkusz, W., Fort, J., Gremillet, D. (2016). Microplastic pollution in the Greenland Sea: Background levels and selective contamination of planktivorous diving seabirds. *Environmental Pollution*, 219, 1131-1139.

Amemiya, I. (1929). On the sex-change of the Japanese common oyster, *Ostrea gigas* Thunberg. *Proceedings of the Imperial Academy*, 5(7), 284-286.

Amiard, J. C., & Amiard-Triquet, C. (2008). Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier Tec et Doc, Paris, pp. 1-16.

Andrady, A.L., 2003. Plastics and the environment. In: Anthony L. Andrady (Ed.) Publisher: John Wiley and Sons, ISBN 0-471-09520-6.

Andrady, A. L. (2011). Microplastics in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 62(8), 1596-1605.

Andrady, A. L. (2015). Persistence of plastic litter in the oceans. In *Marine anthropogenic litter* (pp. 57-72). Springer, Cham.

- Andréfouët, S., Thomas, Y., & Lo, C. (2014). Amount and type of derelict gear from the declining black pearl oyster aquaculture in Ahe atoll lagoon, French Polynesia. *Marine pollution bulletin*, 83(1), 224-230.
- Anton, F. A., Ariz, M., & Alia, M. (1993). Ecotoxic effects of four herbicides (glyphosate, alachlor, chlortoluron and isoproturon) on the algae *Chlorella pyrenoidosa* chick. *Science of the total environment*, 134, 845-851.
- Arrhenius, Å., Grönvall, F., Scholze, M., Backhaus, T., & Blanck, H. (2004). Predictability of the mixture toxicity of 12 similarly acting congeneric inhibitors of photosystem II in marine periphyton and epipsammon communities. *Aquatic Toxicology*, 68(4), 351-367.
- Arthur, C., Baker, J. E., & Bamford, H. A. (2009). Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris, September 9-11, 2008, University of Washington Tacoma, Tacoma, WA, USA.
- Arzul G., Quiniou F., (2014). Plancton marin et pesticides : quels liens ? Quae (Ed) 123p.
- Ashton, K., Holmes, L., & Turner, A. (2010). Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. *Marine pollution bulletin*, 60(11), 2050-2055.
- Atlas du plastique (2020). Faits et chiffres sur le monde des polymères synthétiques. Par La Fondation Heinrich Böll, *La Fabrique Écologique, Zero Waste France et Break Free From Plastic*, 58p.
- Au, S. Y., Bruce, T. F., Bridges, W. C., & Klaine, S. J. (2015). Responses of *Hyalella azteca* to acute and chronic microplastic exposures. *Environmental toxicology and chemistry*, 34(11), 2564-2572.
- Aubert, F., Sauriau, P. G., & Guenneteau, S. (2019). Contrôle de surveillance DCE 2018 de la masse d'eau côtière «FRFC02-Pertuis charentais» pour les herbiers de *Zostera (Zosterella) noltei* Hornemann: Rapport final. Rapport Cohabys, La Rochelle Université-CNRS/UMR LIENSs, 57p.
- Aubertot, J.N., Barbier, J.M., Carpentier, A., Grill, J.J., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., Savini, I., Volz, M., 2005. Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter les impacts environnementaux. Expertise scientifique collective INRA Cemagref, 64 pp.
- 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. *Ifremer*, 96p.
- 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*, 203p. + Annexes.
- 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.
- Autá, H. S., Emenike, C. U., & Fauziah, S. H. (2017). Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment international*, 102, 165-176.
- Avio, C. G., Cardelli, L. R., Gorbi, S., Pellegrini, D., & Regoli, F. (2017). Microplastics pollution after the removal of the Costa Concordia wreck: First evidences from a biomonitoring case study. *Environmental Pollution*, 227, 207-214.

< B >

- Baechler, B. R., Stienbarger, C. D., Horn, D. A., Joseph, J., Taylor, A. R., Granek, E. F., & Brander, S. M. (2020). Microplastic occurrence and effects in commercially harvested North American finfish and shellfish: Current knowledge and future directions. *Limnology and Oceanography Letters*, 5(1), 113-136.
- Bakir, A., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2014). Transport of persistent organic pollutants by microplastics in estuarine conditions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 140, 14-21.
- Baldwin, A. K., Corsi, S. R., & Mason, S. A. (2016). Plastic debris in 29 Great Lakes tributaries: relations to watershed attributes and hydrology. *Environmental Science & Technology*, 50(19), 10377-10385.
- Ballent, A., Purser, A., de Jesus Mendes, P., Pando, S., & Thomsen, L. (2012). Physical transport properties of marine microplastic pollution. *Biogeosciences Discussions*, 9(12).
- Banks, K. E., Turner, P. K., Wood, S. H., & Matthews, C. (2005). Increased toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in mixtures of atrazine and diazinon at environmentally realistic concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(1), 28-36.
- Barillé, L., Prou, J., Héral, M., & Razet, D. (1997). Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection, and absorption of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of experimental marine biology and ecology*, 212(2), 149-172.
- Barnabé, G. 1991. Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture. Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 500 pp.
- Barnes, D. K. (2005). Remote islands reveal rapid rise of southern hemisphere sea debris. *TheScientificWorldJOURNAL*, 5, 915-921.
- Barnes, D. K., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1985-1998.
- Bayne, B.L., Ahrens, M., Allen, S.K., D'auriac, M.A., Backeljau, T., Beninger, P., Bohn, R., Boudry, P., Davis, J., Green, T., Guo, X., Hedgecock, D., Ibarra, A., Kingsley- Smith, P., Krause, M., Langdon, C., Lapègue, S., Li, C., Manahan, D., Mann, R., Perez-Paralle, L., Powell, E.N., Rawson, P.D., Speiser, D., Sanchez, J.-L., Shumway, S., Wang, H., 2017. The proposed dropping of the genus *Crassostrea* for all pacific cupped oysters and its replacement by a new genus *Magallana*: a dissenting view. *Journal of Shellfish Research*, 36(3), 545-548.
- Bayne, B., d'Auriac, M. A., Backeljau, T., Beninger, P., Boudry, P., Carnegie, R., Davis, J., Guo, X., Hedgecock, D., Krause, M., Langdon, C., Lapègue, S., Manahan, D., Mann, R., Powell, E., Shumway, S. (2019). A scientific name for Pacific oysters. *Aquaculture*, 499, 373-373.
- Bayo, J., Guillén, M., Olmos, S., Jiménez, P., Sánchez, E., Roca, M.J., 2018. Microplastics as vector for persistent organic pollutants in urban effluents: the role of poly-chlorinated biphenyls. *International Journal of Sustainable Development and Planning*. 13 (4), 671–682
- Behrens, D., Rouxel, J., Burgeot, T., & Akcha, F. (2016). Comparative embryotoxicity and genotoxicity of the herbicide diuron and its metabolites in early life stages of *Crassostrea gigas*: implication of reactive oxygen species production. *Aquatic Toxicology*, 175, 249-259.
- Beiras, R., & His, E. (1994). Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival, growth and metamorphosis of *Crassostrea gigas* oyster larvae. *Marine Ecology Progress Series*, 95-103.

- Beiras, R., Verdejo, E., Campoy-López, P., & Vidal-Liñán, L. (2021). Aquatic toxicity of chemically defined microplastics can be explained by functional additives. *Journal of Hazardous Materials*, 406, 124338.
- Beketov, M. A., Kefford, B. J., Schäfer, R. B., & Liess, M. (2013). Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(27), 11039-11043.
- Belden, J. B., Gilliom, R. J., & Lydy, M. J. (2007). How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life?. *Integrated Environmental Assessment and Management: An International Journal*, 3(3), 364-372.
- Bellas, J., Martínez-Armentál, J., Martínez-Cámara, A., Besada, V., & Martínez-Gómez, C. (2016). Ingestion of microplastics by demersal fish from the Spanish Atlantic and Mediterranean coasts. *Marine pollution bulletin*, 109(1), 55-60.
- Beman, J. M., Arrigo, K. R., & Matson, P. A. (2005). Agricultural runoff fuels large phytoplankton blooms in vulnerable areas of the ocean. *Nature*, 434(7030), 211-214.
- Ben Kheder, R. (2007). Étude sur le développement larvaire de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) en conditions contrôlées: recherche d'indices de qualité, Study on the larval development of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in controlled conditions for quality signs searches (Doctoral dissertation, Université de Bretagne Occidentale).
- Benitez, F & Bello, A. (Décembre 2020). Perception de la qualité des eaux littorales des Pertuis Charentais par les professionnels (pêche, agriculture, conchyliculture). Synthèse du rapport LITTOPEC : résultats de l'enquête, 16p.
- Bérard, A., & Pelte, T. (1999). Les herbicides inhibiteurs du photosystème II, effets sur les communautés algales et leur dynamique. *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science*, 12(2), 333-361.
- Bergmann, M., & Klages, M. (2012). Increase of litter at the Arctic deep-sea observatory HAUSGARTEN. *Marine pollution bulletin*, 64(12), 2734-2741.
- Bernard, F. (2017). Un système d'information collaboratif en appui à la gouvernance des territoires d'action agro-environnementale à enjeu eau-pesticides (Doctoral dissertation, Paris, Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France).
- 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 (Doctoral dissertation, La Rochelle Université).
- Berthomé, J. P., Razet, D., & Garnier, J. (1981). Description, évolution et importance des différentes techniques de captage en rivière Seudre (bassin de Marennes-Oléron): incidence sur la production d'huîtres creuses *C. gigas*. In *CIEM Conseil International pour l'Exploration de la mer*, 15p.
- Besseling, E., Wang, B., Lürling, M., & Koelmans, A. A. (2014). Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. *Environmental science & technology*, 48(20), 12336-12343.
- Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., Brate, I. L. N., Schøyen, M. (2017). Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: a review. *Marine environmental research*, 130, 338-365.

- Biais, G., Chia, E., Darbon, D., Tachaires, S., Favoreu, G., Deglise, C., Benoit, D., Benoit, G., Letellier, N. (2004). La pêche et l'ostréiculture dans les pertuis Charentais à l'aube des années 2000. Dynamique des exploitations et système de gestion. *Ifremer*, 194p.
- Bláha, L., Babica, P., & Maršálek, B. (2009). Toxins produced in cyanobacterial water blooms-toxicity and risks. *Interdisciplinary toxicology*, 2(2), 36-41.
- Bocher, P., Piersma, T., Dekinga, A., Kraan, C., Yates, M., Guyot, T. Folmer, E. O., Radenac, G., (2007). Site- and species-specific distribution patterns of molluscs at five intertidal soft-sediment areas in northwest Europe during a single winter. *Mar Biol* 151: 577-594.
- Booth, A. M., & Sørensen, L. (2020). Microplastic Fate and Impacts in the Environment. *Handbook of Microplastics in the Environment*, 1-24.
- Borély, J., & Bono, M. (2012). Maintenir le dynamisme rochelais face aux enjeux de la périurbanisation. Insee, 24p.
- Bossuet, L., & Boutry, O. (2012). Conflits d'usage et de voisinage autour de la ressource en eau. Illustration à partir du littoral charentais. *Économie rurale. Agricultures, alimentations, territoires*, (332), 74-87.
- Bost, F., & Messaoudi, D. (2017). La désindustrialisation : quelles réalités dans le cas français ? *Revue géographique de l'Est*, 57(1-2).
- Bouba-Olga, O., Chauchefoin, P., & Mathé, J. (2006). Innovation et territoire : une analyse des conflits autour de la ressource en eau, le cas du bassin-versant de la Charente. *Flux*, (1), 32-41.
- Boucher, J., Friot, D., & Boucher, J. (2020). Microplastiques primaires dans les océans : évaluation mondiale des sources. IUCN, 43p.
- Bouchet J.-M., Deltreil, J.-P., Manaud, F., Maurer, D., Trut, G., 1997. Etude intégrée du Bassin d'Arcachon. Volume 1. Report *Ifremer*, Arcachon, 185 pp. + annexes.
- Boudh, S., & Singh, J. S. (2019). Pesticide contamination: environmental problems and remediation strategies. In *Emerging and eco-friendly approaches for waste management* (pp. 245-269). Springer, Singapore.
- Boudry, P., Naciri, Y., Launey, S., Ledu, C., Phelipot, P., Heurtebise, S., & Gerard, A. (1994). Acclimatation de nouvelles espèces d'huîtres creuses du genre *Crassostrea*: hybridation et conservatoire de souches. Contrat Région Poitou-Charentes 1994-1998-1ère partie : rapport année 1994. *Ifremer*, 59p.
- Bougrier, S., Collet, B., Geairon, P., Geffard, O., Héral, M., and Deslous-Paoli, J. M. 1998. Respiratory time activity of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 219: 205 – 216.
- Bougrier, S., Geairon, P., Deslous-Paoli, J. M., Bacher, C., and Jonquières, G. 1995. Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 134: 143 – 154.
- Bougrier, S., Hawkins, A. J., and Héral, M. 1997. Preingestive selection of different microalgae mixtures in *Crassostrea gigas* and, *M. edulis* analysed by flow cytometry. *Aquaculture*, 150: 123 – 134.
- Boukadida, K., Cachot, J., Ramirez, A. R., Clérandeau, C., & Banni, M. (2017, November). Swimming Behavior and Acetylcholinesterase Activity of the D-Larvae of the Mediterranean Mussel *Mytilus Galloprovincialis*

- Exposed to Copper and/or Silver at Different Temperatures. In *Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration* (pp. 1649-1650). Springer, Cham.
- Bouwmeester, H., Hollman, P. C., & Peters, R. J. (2015). Potential health impact of environmentally released micro-and nanoplastics in the human food production chain: experiences from nanotoxicology. *Environmental science & technology*, *49*(15), 8932-8947.
- Breitwieser, M., Barbarin, M., Plumejeaud-Perreau, C., Dubillot, E., Guyot, T., Huet, V., Churlaud, C., Coulombier, T., Brenon, I., Fichet, D., Imbert, N., Thomas, H. (2020a). Biomonitoring of *Mimachlamys varia* transplanted to areas impacted by human activities (La Rochelle Marina, France). *Chemosphere*, *243*, 125199.
- Breitwieser, M., Bruneau, M., Barbarin, M., Churlaud, C., Mouneyrac, C., & Thomas, H. (2020b). Is metallothionein in *Mimachlamys varia* a suitable biomarker of trace elements in the waters of the French Atlantic coast?. *Environmental Science and Pollution Research*, *27*(16), 20259-20272.
- Breitwieser, M., Dubillot, E., Barbarin, M., Churlaud, C., Huet, V., Muttin, F., & Thomas, H. (2018). Assessment of the biological quality of port areas: A case study on the three harbours of La Rochelle: The marina, the fishing harbour and the seaport. *PloS one*, *13*(6), e0198255.
- Breitwieser, M., Viricel, A., Graber, M., Murillo, L., Becquet, V., Churlaud, C., Fruitier-Arnaudin, I., Huet, V., Lacroix, C., Pante, E., Le Floch, S., Thomas-Guyon, H. (2016). Short-term and long-term biological effects of chronic chemical contamination on natural populations of a marine bivalve. *PloS one*, *11*(3), e0150184.
- Bretaud, S., Toutant, J. P., & Saglio, P. (2000). Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *47*(2), 117-124.
- Brooks, A. L., Wang, S., & Jambeck, J. R. (2018). The Chinese import ban and its impact on global plastic waste trade. *Science advances*, *4*(6), eaat0131.
- Browne, M. A. (2015). Sources and pathways of microplastics to habitats. *Marine anthropogenic litter*, 229-244.
- Browne, M. A., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., & Thompson, R. (2011). The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environ Sci Technol*, *45*(21), 9175-9179.
- Browne, M. A., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. M., & Thompson, R. C. (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental science & technology*, *42*(13), 5026-5031.
- Bry, C. et Hoflack, P. (2004) « Le bassin versant de la Charente : une illustration des problèmes posés par la gestion quantitative de l'eau », *Courrier de l'environnement de l'INRA*, *52*, p. 81-96.
- Buestel, D., Ropert, M., Prou, J. et Gouletquer, P. (2009). History, status, and future of oyster culture in France. *Journal of Shellfish Research*, *28*(4):813–820.
- Burgeot T., Gagnaire B., Renault T., Haure J., Moraga D., David E., Boutet I., Sauriau P.G., Malet N., Bouchet V., Le Roux F., Lapègue S., Bouilly K., Le Moullac G., Arzul I., Knoery J., Quiniou F., Bacher C., Soletchnik P., (2007). Les risques associés au stress environnemental. In: Samain, F., Mc Combie, H. (Eds.), Mortalité estivale de l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Défi Morest Ed. Ifremer/Quae, pp. 95-139.

Butault J.-P., Delame N., Jacquet F. and Zardet G. (2011). *L'utilisation des pesticides en France : état des lieux et perspectives de réduction*, ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche, Centre d'études et de prospective - Notes et Etudes socio-économiques 35, 7-26.

< C >

Cajeri, P., Curti, C., Lafon, V., Launay, R., & Sauriau, P. G. (2012). Cartographie des habitats intertidaux des sites Natura 2000 des Pertuis Charentais : complémentarité des approches inventaire terrain, télédétection et SIG. *Actes des XIIIèmes Journées Nationales Génie Côtier–Génie Civil*, 855-864.

Candau J., Deldrève V., Deuffic P., 2012, « Publicisation contrôlée de problèmes territoriaux autour de l'eau. Le cas des Pertuis charentais (France) », *SociologieS [En ligne]* : <http://sociologies.revues.org/3822>

Carbery, M., O'Connor, W., & Palanisami, T. (2018). Trophic transfer of microplastics and mixed contaminants in the marine food web and implications for human health. *Environment international*, 115, 400-409.

Carles, L., Joly, M., Bonnemoy, F., Lereboure, M., Donnadiou, F., Batisson, I., & Besse-Hoggan, P. (2018). Biodegradation and toxicity of a maize herbicide mixture: mesotrione, nicosulfuron and S-metolachlor. *Journal of hazardous materials*, 354, 42-53.

Carmichael, W. W. (1994). The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, 270(1), 78-86.

Carriker, M. R. (1951). Ecological observations on the distribution of oyster larvae in New Jersey estuaries. *Ecological Monographs*, 21(1), 19-38.

Caruso, G. (2019). Microplastics as vectors of contaminants. *Marine pollution bulletin*, 146, 921-924.

Castrec, J., Soudant, P., Payton, L., Tran, D., Miner, P., Lambert, C., Le Goic, N., Huvet, A., Quillien, V., Boullot, F., Amzil, Z., Hégaret, H., Fabioux, C. (2018). Bioactive extracellular compounds produced by the dinoflagellate *Alexandrium minutum* are highly detrimental for oysters. *Aquatic Toxicology*, 199, 188-198.

Castro, O. G., Ferreira, A. M., & Vale, C. (1991). Transport and distribution of DDT and PCB in the upper Sado estuary, and accumulation in oysters: importance of runoff. In *Organic micropollutants in the aquatic environment* (pp. 80-88). Springer, Dordrecht.

Cau, A., Avio, C. G., Dessì, C., Follesa, M. C., Moccia, D., Regoli, F., & Pusceddu, A. (2019). Microplastics in the crustaceans *Nephrops norvegicus* and *Aristeus antennatus*: Flagship species for deep-sea environments? *Environmental Pollution*, 255, 113107.

Chae, Y., & An, Y. J. (2017). Effects of micro-and nanoplastics on aquatic ecosystems: Current research trends and perspectives. *Marine pollution bulletin*, 124(2), 624-632.

Chaillou, A. (2018). Nos moules meurent à cause de leur milieu naturel. *Revue Projet*, (6), 81-87.

Chambon, C., Legeay, A., Durrieu, G., Gonzalez, P., Ciret, P., & Massabuau, J. C. (2007). Influence of the parasite worm *Polydora sp.* on the behaviour of the oyster *Crassostrea gigas*: a study of the respiratory impact and associated oxidative stress. *Marine Biology*, 152(2), 329-338.

Chen, Q., Gundlach, M., Yang, S., Jiang, J., Velki, M., Yin, D., & Hollert, H. (2017). Quantitative investigation of the mechanisms of microplastics and nanoplastics toward zebrafish larvae locomotor activity. *Science of the total environment*, 584, 1022-1031.

Références

- Chen, M., Jin, M., Tao, P., Wang, Z., Xie, W., Yu, X., & Wang, K. (2018). Assessment of microplastics derived from mariculture in Xiangshan Bay, China. *Environmental Pollution*, *242*, 1146-1156.
- Chen, Q., Lackmann, C., Wang, W., Seiler, T. B., Hollert, H., & Shi, H. (2020). Microplastics lead to hyperactive swimming behaviour in adult zebrafish. *Aquatic Toxicology*, *224*, 105521.
- Chen, G., Li, Y., & Wang, J. (2021). Occurrence and ecological impact of microplastics in aquaculture ecosystems. *Chemosphere*, 129989.
- Chevalier C. et D. Masson, 1988. Agriculture, conchyliculture et circulation des eaux en Charente-Maritime. Etat actuel des recherches. *Aqua. Revue*, *21* : 27-33.
- Cho, Y., Shim, W. J., Jang, M., Han, G. M., & Hong, S. H. (2019). Abundance and characteristics of microplastics in market bivalves from South Korea. *Environmental pollution*, *245*, 1107-1116.
- Choblet, C. (2005). *Espace littoral et décisions d'aménagement, Limites et potentialités des études d'impact et des enquêtes publiques. Exemple du littoral atlantique français* (Doctoral dissertation, Université de Nantes).
- Claessens, M., De Meester, S., Van Landuyt, L., De Clerck, K., & Janssen, C. R. (2011). Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. *Marine pollution bulletin*, *62*(10), 2199-2204.
- CNC (Comité National de la Conchyliculture), 2006 ; Les statistiques. www.cnc-france.com (accessed October 2020).
- CNC (Comité National de la Conchyliculture), 2020 ; Les statistiques. www.cnc-france.com (accessed October 2020).
- Coen, L. D., & Luckenbach, M. W. (2000). Developing success criteria and goals for evaluating oyster reef restoration: ecological function or resource exploitation? *Ecological engineering*, *15*(3-4), 323-343.
- Cole, M., & Galloway, T. S. (2015). Ingestion of nanoplastics and microplastics by Pacific oyster larvae. *Environmental science & technology*, *49*(24), 14625-14632.
- Cole, M., Lindeque, P. K., Fileman, E., Clark, J., Lewis, C., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2016). Microplastics alter the properties and sinking rates of zooplankton faecal pellets. *Environmental science & technology*, *50*(6), 3239-3246.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2015). The impact of polystyrene microplastics on feeding, function, and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. *Environmental science & technology*, *49*(2), 1130-1137.
- Cole, M., Lindeque, P., Fileman, E., Halsband, C., Goodhead, R., Moger, J., & Galloway, T. S. (2013). Microplastic ingestion by zooplankton. *Environmental science & technology*, *47*(12), 6646-6655.
- Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., & Galloway, T. S. (2011). Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. *Marine pollution bulletin*, *62*(12), 2588-2597.
- Collignon, A., Hecq, J. H., Glagani, F., Voisin, P., Collard, F., & Goffart, A. (2012). Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. *Marine pollution bulletin*, *64*(4), 861-864.

Références

Commission européenne. Descriptor 10: Marine litter. C. le 15 juillet 2020, https://ec.europa.eu/environment/marine/good-environmental-status/descriptor-10/index_en.htm (accès en Avril, 2021).

Conley, D. J., Paerl, H. W., Howarth, R. W., Boesch, D. F., Seitzinger, S. P., Havens, K. E., Lancelot, C., Likens, G. E. (2009). Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science*, 323(5917), 1014-1015.

Connor, P. M. (1972). Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. *Marine Pollution Bulletin*, 3(12), 190-192.

Constant, M., Kerhervé, P., Mino-Vercellio-Verollet, M., Dumontier, M., Vidal, A. S., Canals, M., & Heussner, S. (2019). Beached microplastics in the northwestern Mediterranean Sea. *Marine pollution bulletin*, 142, 263-273.

Corami, F., Rosso, B., Roman, M., Picone, M., Gambaro, A., & Barbante, C. (2020). Evidence of small microplastics (< 100 µm) ingestion by Pacific oysters (*Crassostrea gigas*): A novel method of extraction, purification, and analysis using Micro-FTIR. *Marine Pollution Bulletin*, 160, 111606.

Cormier, B., Gambardella, C., Tato, T., Perdriat, Q., Costa, E., Veclin, C., Le Bihanic, F., Grassl, B., Dubocq, F., Karrman, A., Van Arkel, K., Lemoine, S., Lagarde, F., Morin, B., Garaventa, F., Faimali, M., Cousin, X., Bégout, M.L., Cachot, J. (2021). Chemicals sorbed to environmental microplastics are toxic to early life stages of aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111665.

Covernton, G. A., Collicutt, B., Gurney-Smith, H. J., Pearce, C. M., Dower, J. F., Ross, P. S., & Dudas, S. E. (2019). Microplastics in bivalves and their habitat in relation to shellfish aquaculture proximity in coastal British Columbia, Canada. *Aquaculture Environment Interactions*, 11, 357-374.

Cox, K. D., Covernton, G. A., Davies, H. L., Dower, J. F., Juanes, F., & Dudas, S. E. (2019). Human consumption of microplastics. *Environmental science & technology*, 53(12), 7068-7074.

Cózar, A., Echevarría, F., González-Gordillo, J. I., Irigoien, X., Úbeda, B., Hernández-León, S., Palma, A.T., Navarro, S., Garcia-de-Lomas, J., Ruiz, A., Fernandes-de-Puelles, M.L., Duarte, C. M. (2014). Plastic debris in the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), 10239-10244.

CREAA, Flash Info Maline n°43, État des mortalités d'huitres et de moules à la date du 17 septembre 2020. https://creaa.pagesperso-orange.fr/doc/27_FIM.pdf (accessed December 2020).

< D >

Dabrin A., (2009). *Mécanismes de transfert des éléments traces métalliques et réactivité estuarienne. Cas des systèmes Gironde, Charente, Seudre et Baie de Marennes Oléron*. Thèse, University of Bordeaux, 375pp.

Daniel, D. B., Ashraf, P. M., Thomas, S. N., & Thomson, K. T. (2021). Microplastics in the edible tissues of shellfishes sold for human consumption. *Chemosphere*, 264, 128554.

DDTM (2016). Présentation des réseaux de suivi de la qualité de l'eau en Charente-Maritime, 57p.

[https://www.charente-maritime.gouv.fr/content/download/34777/221847/file/DDTM17_Synthèse%20réseau%20qualité%20eaux_versi on%20finale_dec%202016\(1\).pdf](https://www.charente-maritime.gouv.fr/content/download/34777/221847/file/DDTM17_Synthèse%20réseau%20qualité%20eaux_versi on%20finale_dec%202016(1).pdf) (consulté en Décembre 2020).

De Bon, H., Temple, L., Malézieux, E., Bendjebbar, P., Fouilleux, E., & Silvie, P. (2018). L'agriculture biologique en Afrique : un levier d'innovations pour le développement agricole. *Perspective-Cirad*, 1-4.

- DeCourten, B., Romney, A., & Brander, S. (2019). The heat is on: Complexities of aquatic endocrine disruption in a changing global climate. *Separation science and technology*, 11, 13-49.
- De Groot, R. S., Alkemade, R., Braat, L., Hein, L., & Willemsen, L. (2010). Challenges in integrating the concept of ecosystem services and values in landscape planning, management and decision making. *Ecological complexity*, 7(3), 260-272.
- Dehaut, A., Cassone, A.-L., Frère, L., Hermabessiere, L., Himber, C., Rinnert, E., Rivière, G., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Duflos, G., & Paul-Pont, I. (2016). Microplastics in seafood: Benchmark protocol for their extraction and characterization. *Environmental Pollution*, 215, 223-233.
- Della Torre, C., Bergami, E., Salvati, A., Faleri, C., Cirino, P., Dawson, K. A., & Corsi, I. (2014). Accumulation and embryotoxicity of polystyrene nanoparticles at early stage of development of sea urchin embryos *Paracentrotus lividus*. *Environmental science & technology*, 48(20), 12302-12311.
- Deneer, J. W. (2000). Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 56(6), 516-520.
- De Montaudouin, X., & Sauriau, P. G. (2000). Contribution to a synopsis of marine species richness in the Pertuis Charentais Sea with new insights in soft-bottom macrofauna of the Marennes-Oléron Bay. *CBM-Cahiers de Biologie Marine*, 41(2), 181-222.
- Derraik, J. G. (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine pollution bulletin*, 44(9), 842-852.
- de Sá, L. C., Luís, L. G., & Guilhermino, L. (2015). Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. *Environmental pollution*, 196, 359-362.
- De Sá, L. C., Oliveira, M., Ribeiro, F., Rocha, T. L., & Futter, M. N. (2018). Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: what do we know and where should we focus our efforts in the future? *Science of the total environment*, 645, 1029-1039.
- Desforges, J. P. W., Galbraith, M., Dangerfield, N., & Ross, P. S. (2014). Widespread distribution of microplastics in subsurface seawater in the NE Pacific Ocean. *Marine pollution bulletin*, 79(1-2), 94-99.
- DGE (2019) *Mémento du tourisme : Édition 2018*.
https://www.entreprises.gouv.fr/files/files/directions_services/etudes-et-statistiques/stats-tourisme/memento/2018/MEMENTO TOURISME Edition2018-WEB.pdf
- Dinamani, P. (1991). Introduced Pacific oysters in New Zealand. *The ecology of C. gigas in Australia, New Zealand, France and Washington State (Eds.)*, Maryland Sea Grant College, MD, 9-12.
- Dong, H., Chen, Y., Wang, J., Zhang, Y., Zhang, P., Li, X., Zou, J., Zhou, A. (2020). Interactions of microplastics and antibiotic resistance genes and their effects on the aquaculture environments. *Journal of Hazardous Materials*, 123961.
- Drinkwaard, A. C. (1999). History of cupped oyster in European coastal waters. *Aquaculture Europe: Magazine of the European Aquaculture Society*, 24: 7-11 + 41.
- Dris, R., Lahens, L., Rocher, V., Gasperi, J., & Tassin, B. (2016). Premières investigations sur les microplastiques en Seine. PIREN-Seine – phase VII – rapport 2016, 24p.

Dubaish, F., & Liebezeit, G. (2013). Suspended microplastics and black carbon particles in the Jade system, southern North Sea. *Water, air, & soil pollution*, 224(2), 1-8.

Dupré M. (2013) Représentations sociales du tri sélectif et des déchets en fonction des pratiques de tri. *Les Cahiers Internationaux de Psychologie Sociale*, 98, 173-209.

Dussud C., Ghiglione J.-F. (2014) La dégradation des plastiques en mer. Société française d'Ecologie, *Regards et débats sur la biodiversité*, 63, 9p.

< E >

EauFrance, 2016. <http://www.data.eaufrance.fr> (consulté en Décembre 2020).

E.C. (2008). Review report for the active substance boscalid. EU Restricted. European Commission.

Ecophyto – Notes de suivis 2018-2019. <https://ecophytopic.fr/sites/default/files/2020-02/ecophyto-note-de-suivi-2018-2019-vdef-comprese.pdf> (accès en Avril, 2021).

EEA (2000). Management of contaminated sites in Western Europe. Topic report No 13/1999, European Environment Agency, pp. 44-50.

EFSA (2007). "Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance nicosulfuron." EFSA Scientific Report 120: 1-91.

El Hadri, H., Gigault, J., Mounicou, S., Grassl, B., & Reynaud, S. (2020). Trace element distribution in marine microplastics using laser ablation-ICP-MS. *Marine Pollution Bulletin*, 160, 111716.

Ellis, I., & Kempf, S. C. (2011). Characterization of the central nervous system and various peripheral innervations during larval development of the oyster *Crassostrea virginica*. *Invertebrate Biology*, 130(3), 236-250.

Elskus, A. A., & Hackley, P. C. (2012). *Toxicity, sublethal effects, and potential modes of action of select fungicides on freshwater fish and invertebrates* (p. 49). US Department of the Interior, US Geological Survey.

Enders, K., Lenz, R., Stedmon, C. A., & Nielsen, T. G. (2015). Abundance, size and polymer composition of marine microplastics $\geq 10 \mu\text{m}$ in the Atlantic Ocean and their modelled vertical distribution. *Marine pollution bulletin*, 100(1), 70-81.

Eno NC, Clark RA, and Sanderson WG (Eds.) 1997. Non-native marine species in British waters: a review and directory. Peterborough, UK: Joint Nature Conservation Committee, 152 pp.

Eriksen, M., Lebreton, L. C., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., Galgani, F., Ryan, P.G., Reisser, J. (2014). Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PloS one*, 9(12), e111913.

Erni-Cassola, G., Zadjelovic, V., Gibson, M. I., & Christie-Oleza, J. A. (2019). Distribution of plastic polymer types in the marine environment; A meta-analysis. *Journal of hazardous materials*, 369, 691-698.

European Bioplastics, nova-institute (2020).

<https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/materials/> (consulté en Décembre 2020).

European Commission, Joint Research Centre, Institute for Environment and Sustainability, & MSFD Technical Subgroup on Marine Litter. (2013). *Guidance on monitoring of marine litter in European seas*. Publications Office. <http://dx.publications.europa.eu/10.2788/99475>

European Parliament and the Council. Directive (EU) 2015/ 720 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2015 amending Directive 94/62/EC as regards reducing the consumption of lightweight plastic carrier bags; Official Journal of the European Union, 2015, L115/11, 4.

Eurostat (2016) Waste Statistics. Eurostat, Luxembourg, Luxembourg. See http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Waste_statistics (accessed December, 2020).

Everaert, G., Van Cauwenberghe, L., De Rijcke, M., Koelmans, A. A., Mees, J., Vandegehuchte, M., & Janssen, C. R. (2018). Risk assessment of microplastics in the ocean: Modelling approach and first conclusions. *Environmental pollution*, 242, 1930-1938.

Expéditions MED, 2016. Opération déchets cotiers. <http://www.expeditionmed.eu/fr/category/nos-programmes/programme-d-actions/operation-dechets-sales/> (consulté en Janvier 2021).

< F >

Fang, C., Zheng, R., Chen, H., Hong, F., Lin, L., Lin, H., Guo, H., Bailey, C., Segner, H., Mu, J., Bo, J. (2019). Comparison of microplastic contamination in fish and bivalves from two major cities in Fujian province, China and the implications for human health. *Aquaculture*, 512, 734322.

FAO (2008). An introduction to the basic concepts of food security. Rome Food and Agriculture Organisation. www.fao.org/3/a-al936e.pdf (Accessed December 2020).

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 2012 *Food and Agriculture Organization of the United Nations Crop Production and Trade Statistics* <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (accessed in December, 2020).

FAO (2015). Fisheries and Aquaculture Department. *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/ (accessed in November, 2020).

FAO (2016). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all*. Rome. 200 pp.

Fendall, L. S., & Sewell, M. A. (2009). Contributing to marine pollution by washing your face: microplastics in facial cleansers. *Marine pollution bulletin*, 58(8), 1225-1228.

Fodrie, F. J., Rodriguez, A. B., Gittman, R. K., Grabowski, J. H., Lindquist, N. L., Peterson, C. H., Piehler, M.F., Ridge, J. T. (2017). Oyster reefs as carbon sources and sinks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1859), 20170891.

Fondation Nicolas Hulot, 2021. Rapport produit par le think tank, publié le 09 Février 2021. Réduction des pesticides en France : pourquoi un tel échec ? (Accès en ligne, Février 2021). <https://www.fondation-nicolas-hulot.org/wp-content/uploads/2021/02/TT-rapport-agriculture-fev-2021.pdf>

Fosse, J., Aussilloux, V., Grémillet, A., & Mesqui, B. (2019). Faire de la politique agricole commune un levier de la transition agroécologique. *France stratégie*, 31p.

Références

Fossi, M. C., Marsili, L., Bains, M., Giannetti, M., Coppola, D., Guerranti, C., Caliani, I., Minutoli, R., Lauriano, G., Finoi, M.G., Rubegni, F., Panigada, S., Bérubé, M., Ramirez, J.U., Panti, C. (2016). Fin whales and microplastics: the Mediterranean Sea and the Sea of Cortez scenarios. *Environmental Pollution*, 209, 68-78.

France 3, 2019. <https://france3-regions.francetvinfo.fr/nouvelle-aquitaine/charente-maritime/la-rochelle/ville-rochelle-interdit-utilisation-pesticides-son-territoire-1736657.html> (consulté en Décembre 2020).

FranceAgrimer, 2020. Chiffres clés des filières pêche et aquaculture en France, en 2020. <https://www.franceagrimer.fr/fam/content/download/64767/document/CC%20pêche%20aqua%20FR.pdf?version=2> (consulté en Février 2021).

Frère, Laura. (2017). *Les microplastiques : Une menace en rade de Brest ?* (Doctoral dissertation, Brest).

Frère, L., Paul-Pont, I., Rinnert, E., Petton, S., Jaffré, J., Bihannic, I., Soudant, P., Lambert, C., Huvet, A. (2017). Influence of environmental and anthropogenic factors on the composition, concentration, and spatial distribution of microplastics: a case study of the Bay of Brest (Brittany, France). *Environmental Pollution*, 225, 211-222.

Frias, J. P. G. L., Gago, J., Otero, V., & Sobral, P. (2016). Microplastics in coastal sediments from Southern Portuguese shelf waters. *Marine environmental research*, 114, 24-30.

Frias, J. P. G. L., Sobral, P., & Ferreira, A. M. (2010). Organic pollutants in microplastics from two beaches of the Portuguese coast. *Marine pollution bulletin*, 60(11), 1988-1992.

Froidefond, J. M., Jegou, A. M., Hermida, J., Lazure, P., & Castaing, P. (1998). Variability of the Gironde turbid plume by remote sensing. Effects of climatic factors. *Oceanologica Acta*, 2(21), 191-207.

Frydkjær, C. K., Iversen, N., & Roslev, P. (2017). Ingestion and egestion of microplastics by the cladoceran *Daphnia magna*: effects of regular and irregular shaped plastic and sorbed phenanthrene. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 99(6), 655-661.

Fungicide Resistance Action Committee, 2012, FRAC code list fungicides sorted by mode of action including FRAC code numbering, accessed August 23, 2012, at <http://www.frac.info/frac/index.htm>

< G >

Gagnaire, B., Gay, M., Huvet, A., Daniel, J. Y., Saulnier, D., & Renault, T. (2007). Combination of a pesticide exposure and a bacterial challenge: in vivo effects on immune response of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquatic toxicology*, 84(1), 92-102.

Gagnaire, B., Geret, F., Haure, J., Martin, J-L., Burgeot, T., Thomas-Guyon, & H., Renault, T. (2003). Effets d'un mélange de pesticides sur les hémocytes d'huître creuse, *Crassostrea gigas*. IIIe Congrès International des Sociétés Européennes de Malacologie ; La Rochelle 24-27 juin 2003.

Gago, J., Henry, M., & Galgani, F. (2015). First observation on neustonic plastics in waters off NW Spain (spring 2013 and 2014). *Marine environmental research*, 111, 27-33.

Galgani F. (2011) Macro-déchets en Méditerranée française : Etat des connaissances, analyses des données de la surveillance et recommandations. RST.ODE/LER-PAC/11-03, 47p.

Galgani, F., Hanke, G., Werner, S. D. V. L., & De Vrees, L. (2013a). Marine litter within the European marine strategy framework directive. *ICES Journal of Marine Science*, 70(6), 1055-1064.

- Galgani F., Poitou I., Colasse L. (2013b) Une mer propre, mission impossible ? 70 clés pour comprendre les déchets en mer. Editions Quæ, 176p.
- Galloway, T. S. (2015). Micro-and nano-plastics and human health. In *Marine anthropogenic litter* (pp. 343-366). Springer, Cham.
- Galtsoff, P. S. (1938). Physiology of reproduction of *Ostrea virginica*: II. Stimulation of spawning in the female oyster. *The Biological Bulletin*, 75(2), 286-307.
- Gamain, P. (2016). *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* (Doctoral dissertation), 342p.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Clérandeau, C., Mazzella, N., Gourves, P. Y., & Morin, B. (2017). Combined effects of temperature and copper and S-metolachlor on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine pollution bulletin*, 115(1-2), 201-210.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Pardon, P., Tapie, N., Gourves, P. Y., Budzinski, H., Morin, B. (2016). Combined effects of pollutants and salinity on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine environmental research*, 113, 31-38.
- Gamain, P., Roméro-Ramirez, A., Gonzalez, P., Mazzella, N., Gourves, P. Y., Compan, C., Morin, B., Cachot, J. (2020). Assessment of swimming behavior of the Pacific oyster D-larvae (*Crassostrea gigas*) following exposure to model pollutants. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(4), 3675-3685.
- Garçon, N. (2016). La Charente-Maritime à grands traits. http://www.epsilon.insee.fr/jspui/bitstream/1/41513/1/IA_ALPC_13.pdf (consulté en Janvier, 2021).
- Gardon, T., Huvet, A., Paul-Pont, I., Cassone, A. L., Koua, M. S., Soyez, C., Jezequel, R., Receveur, J., Le Moullac, G. (2020). Toxic effects of leachates from plastic pearl-farming gear on embryo-larval development in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Water Research*, 115890.
- 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(6), 403-416.
- Geffard, A., Geffard, O., Amiard, J. C., His, E., & Amiard-Triquet, C. (2007). Bioaccumulation of metals in sediment elutriates and their effects on growth, condition index, and metallothionein contents in oyster larvae. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 53(1), 57-65.
- Gerdes, D. 1983. The Pacific oyster *C. gigas*. Part 1: Feeding behaviour of larvae and adults. *Aquaculture*, 31: 195 – 219.
- Gerigny, O., Brun, M., Tomasino, C., Le Moigne, M., Lacroix, C., Kerambrun, L., & Galgani, F. (2017). DCSMM2018-D10C2-Densité de microplastiques flottants entre 2012 et 2016. *Ifremer*.
- GESAMP, 2010. in: Proceedings of the GESAMP international workshop on plasticparticles as a vector in transporting persistent, bio-accumulating and toxic substances in the oceans. Bowmer, T., Kershaw, P.J., (Eds.) 2010 GESAMP Rep.Stud. No. 82, p. 68.
- GESAMP, 2015. Sources, Fate and Effects of Microplastics in the Marine Environment: a Global Assessment (IMO/FAO/UNESCO-IOC/UNIDO/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNDP Joint Group of Experts on the Scientific

- Aspects of Marine Environmental Protection). Rep. Stud. GESAMP No. 90, in: P.J. Kershaw (Ed.). http://ec.europa.eu/environment/marine/good-environmental-status/descriptor-10/pdf/GESAMP_microplastics%20full%20study.pdf
- Geyer, R., 2020. Production, use, and fate of synthetic polymers. *Plast. Waste Recycl.* 13–3.
- Gilbert, R., & Duret, J. (2014). Recensement de la conchyliculture 2012. La Charente-Maritime est le premier département producteur de coquillages. <http://www.epsilon.insee.fr/jspui/handle/1/24415> (consulté en Novembre 2020).
- Gilfillan, L. R., Ohman, M. D., Doyle, M. J., Watson, W. Occurrence of plastic micro-debris in the Southern California Current System. CalCOFI Rep. 2009, 50, 123–133.
- Glize, P. (1992). Manuel de télécaptage de larves d'huître creuse (*Crassostrea Gigas*) sur microbrisure. *Syndicat mixte pour le développement aquacole en pays de la Loire*, 22p.
- Goldstein, M. C., & Goodwin, D. S. (2013). Gooseneck barnacles (*Lepas* spp.) ingest microplastic debris in the North Pacific Subtropical Gyre. *PeerJ*, 1, e184.
- González-Fernández, C., Tallec, K., Le Goïc, N., Lambert, C., Soudant, P., Huvet, A., Suquet, M., Berchel, M., Paul-Pont, I. (2018). Cellular responses of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) gametes exposed in vitro to polystyrene nanoparticles. *Chemosphere*, 208, 764-772.
- Gouin, T., Roche, N., Lohmann, R., & Hodges, G. (2011). A thermodynamic approach for assessing the environmental exposure of chemicals absorbed to microplastic. *Environmental Science & Technology*, 45(4), 1466-1472.
- Gouletquer, P., Héral, M., 1997. Marine molluscan production trends in France: from fisheries to aquaculture. In: MacKenzie, C.L., Burrell, V.G., Rosenfield, A., Hobart, W. (Eds.), *The History, Present Condition, and Future of the Molluscan Fisheries of North America and Europe*. NOAA Technical Report NMFS 129, Department of Commerce, Seattle, Washington, pp. 137–164.
- Gouletquer, P., Le Mao, P. 2018. Journée d'échange transfrontalière. Prévention des espèces exotiques envahissantes, 16 et 17/05/2018 à Concarneau.
- Gouletquer, P., Wolowicz, M., Latala, A., Brown, C., and Cragg, S. 2004. Application of a micro respirometric volumetric method to respiratory measurements of larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources*, 17: 195 – 200.
- Gouletquer, P., Wolowicz, M., Latala, A., Geairon, P., Huvet, A., and Boudry, P. 1999. Comparative analysis of oxygen consumption rates between cupped oyster spat of *Crassostrea gigas* of French, Japanese, Spanish and Taiwanese origins. *Aquatic Living Resources*, 12: 271 – 277.
- Grabowski, J. H., Brumbaugh, R. D., Conrad, R. F., Keeler, A. G., Opaluch, J. J., Peterson, C. H., Piehler, M.F., Powers, S.P., Smyth, A. R. (2012). Economic valuation of ecosystem services provided by oyster reefs. *Bioscience*, 62(10), 900-909.
- Graham, P., Palazzo, L., de Lucia, G. A., Telfer, T. C., Baroli, M., & Carboni, S. (2019). Microplastics uptake and egestion dynamics in Pacific oysters, *Magallana gigas* (Thunberg, 1793), under controlled conditions. *Environmental pollution*, 252, 742-748.

Grapin, P. (2017). Les migrations internes en France: un marqueur essentiel de l'attractivité des territoires. *Population Avenir*, (4), 4-7.

Green, D. S. (2016). Effects of microplastics on European flat oysters, *Ostrea edulis* and their associated benthic communities. *Environmental pollution*, 216, 95-103.

Grelon, M. (1978). Saintonge, pays des huîtres vertes. *Editions Rupella, La Rochelle*.

Grizel, H., & Héral, M. (1991). Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *ICES Journal of Marine Science*, 47(3), 399-403.

Gruber, N., & Galloway, J. N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451(7176), 293-296.

Guévelou, E., Huvet, A., Sussarellu, R., Milan, M., Guo, X., Li, L., Zhang, G., Quillien, V., Daniel, J.Y., Quéré, C., Boudry, P., Corporeau, C. (2013). Regulation of a truncated isoform of AMP-activated protein kinase α (AMPK α) in response to hypoxia in the muscle of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Comparative Physiology B*, 183(5), 597-611.

Guichard, L., Dedieu, F., Jeuffroy, M. H., Meynard, J. M., Reau, R., & Savini, I. (2017). Le plan Ecophyto de réduction d'usage des pesticides en France: décryptage d'un échec et raisons d'espérer. *Cahiers Agricultures*, 26(1), 1-12.

Guivarc'h, Blanchoud (2001). *Apports et transfert de pesticides en milieux agricole et urbain dans le bassin versant de la marne: vers une évaluation globale* (Doctoral dissertation, École nationale des ponts et chaussées, France).

Gutiérrez, J. L., Jones, C. G., Strayer, D. L., & Iribarne, O. O. (2003). Mollusks as ecosystem engineers: the role of shell production in aquatic habitats. *Oikos*, 101(1), 79-90.

< H >

Haglund, K. (1997). The use of algae in aquatic toxicity assessment. *Progress in phycological research*, 12, 181-212.

Hallmann, C. A., Foppen, R. P., Van Turnhout, C. A., De Kroon, H., & Jongejans, E. (2014). Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature*, 511(7509), 341-343.

Hartmann, N. B., Rist, S., Bodin, J., Jensen, L. H., Schmidt, S. N., Mayer, P., Meibom, A., Baun, A. (2017). Microplastics as vectors for environmental contaminants: Exploring sorption, desorption, and transfer to biota. *Integrated environmental assessment and management*, 13(3), 488-493.

Hassannejad, S., Ghafarbi, S. P., & Lotfi, R. (2020). The effect of nicosulfuron and bentazon on photosynthetic performance of common cocklebur (*Xanthium strumarium L.*). *Environmental and Sustainability Indicators*, 6, 100026.

Heindler, F. M., Alajmi, F., Huerlimann, R., Zeng, C., Newman, S. J., Vamvounis, G., & van Herwerden, L. (2017). Toxic effects of polyethylene terephthalate microparticles and Di (2-ethylhexyl) phthalate on the calanoid copepod, *Parvocalanus crassirostris*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 141, 298-305.

Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A., (2006) : Hatchery operation: culture of larvae basic methodology, feeding and nutrition, factors influencing growth and survival, and settlement and metamorphosis. Hatchery Culture of Bivalves : *A Practical Manual. FAO Fisheries Technical Paper (471)*.

- Hensen, V., 1887. Über die Bestimmung des Plankton's oder des im Meer treibenden Materials an Pflanzen und Thieren. *Bericht d. Kommission z. Wiss. Untersuch. deutscher Meere*. 5, 108 pp.
- Héral M., 1986. Évolution et état du cheptel conchylicole dans le bassin de Marennes-Oléron : intérêt d'une régulation. DRV/86-06-AQ/TREM, *Ifremer*, 35p.
- Héral, M., Deslous-Paoli, J. M., & Prou, J. (1986). Dynamiques des productions et des biomasses des huîtres creuses cultivées (*Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas*) dans le bassin de Marennes-Oléron depuis un siècle. In *CIEM Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, 41 pp.
- Hermabessiere, L., Dehaut, A., Paul-Pont, I., Lacroix, C., Jezequel, R., Soudant, P., & Duflos, G. (2017). Occurrence and effects of plastic additives on marine environments and organisms: A review. *Chemosphere*, 182, 781-793.
- Hernandez-Gonzalez, A., Saavedra, C., Gago, J., Covelo, P., Santos, M. B., & Pierce, G. J. (2018). Microplastics in the stomach contents of common dolphin (*Delphinus delphis*) stranded on the Galician coasts (NW Spain, 2005–2010). *Marine pollution bulletin*, 137, 526-532.
- Hily, C. (2009). Prolifération de l'huître creuse du pacifique *Crassostrea gigas* sur les côtes Manche-Atlantique françaises : bilan, dynamique, conséquences écologiques, économiques et ethnologiques, expériences et scénarios de gestion. *Rapport LITEAU*, 20.
- His, E. (1975). La détection des pontes dans le milieu naturel : application de l'ostréographie à l'étude de la reproduction des huîtres. In *Colloque international de malacologie marine appliquée*. *Haliotis*, 5, 206-213.
- His, E., Beiras, R., & Seaman, M. N. L. (1999a). The assessment of marine pollution-bioassays with bivalve embryos and larvae. In *Advances in marine biology* (Vol. 37, pp. 1-178). Academic press.
- His, E., Heyvang, I., Geffard, O., & De Montaudouin, X. (1999b). A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water research*, 33(7), 1706-1718.
- His, E. & Seaman, M.N.L. (1993). Effects of twelve pesticides on larvae of oysters (*Crassostrea gigas*) and on two species of unicellular marine algae (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*) *Comm. Meet. Int. Counc. Explor. Sea*. CM-ICES/E 22, 1–8.
- His, E., Seaman, M. N. L., & Beiras, R. (1997). A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Research*, 31(2), 351-355.
- Horton, A. A., & Dixon, S. J. (2018). Microplastics: An introduction to environmental transport processes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, 5(2), e1268.
- Horton, A. A., Vijver, M. G., Lahive, E., Spurgeon, D. J., Svendsen, C., Heutink, R., van Bodegom, P.M., Baas, J. (2018). Acute toxicity of organic pesticides to *Daphnia magna* is unchanged by co-exposure to polystyrene microplastics. *Ecotoxicology and environmental safety*, 166, 26-34.
- Horton, A. A., Walton, A., Spurgeon, D. J., Lahive, E., & Svendsen, C. (2017). Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Science of the total environment*, 586, 127-141.

Références

Howarth, R., Chan, F., Conley, D. J., Garnier, J., Doney, S. C., Marino, R., & Billen, G. (2011). Coupled biogeochemical cycles: eutrophication and hypoxia in temperate estuaries and coastal marine ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 9(1), 18-26.

Huguet, J. R. (2019). *Dynamique hydro-sédimentaire en milieu portuaire : application au port de plaisance de La Rochelle* (Doctoral dissertation, La Rochelle Université).

Huvet, A. (1999). Ressources génétiques chez l'huître creuse *Crassostrea gigas* : variabilité, différenciation et adaptation aux conditions de production en Charente-Maritime-Année 1999. *Ifremer*, 21p.

Huvet, A., Paul-Pont, I., Fabioux, C., Lambert, C., Suquet, M., Thomas, Y., Robbens, J., Soudant, P., Sussarellu, R. (2016). Reply to Lenz et al.: Quantifying the smallest microplastics is the challenge for a comprehensive view of their environmental impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(29), E4123-E4124.

< I >

Ifremer/ODE/LITTORAL/LER/PC/18.10/Laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais (2018). Qualité du Milieu Marin Littoral. Bulletin de la surveillance 2017. Départements de Charente-Maritime et de Vendée (sud). ODE/LITTORAL/LERPC/18-10.

<https://archimer.ifremer.fr/doc/00466/57743/>

Imhof, H. K., Rusek, J., Thiel, M., Wolinska, J., & Laforsch, C. (2017). Do microplastic particles affect *Daphnia magna* at the morphological, life history and molecular level? *PLoS one*, 12(11), e0187590.

Ineris, 2013, Portail substances chimiques (accessed in June 2020). <https://substances.ineris.fr/fr/>

Isensee, K., & Valdes, L. (2015). Marine Litter: Microplastics. *IOC-UNESCO, GSDR*, 3p.

< J >

Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 768-771.

Jeong, J., & Choi, J. (2019). Adverse outcome pathways potentially related to hazard identification of microplastics based on toxicity mechanisms. *Chemosphere*, 231, 249-255.

Journal officiel de l'Union-Européenne (16 février 1998). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:92001E003395&from=PL> (consulté en Juin 2020).

< K >

Kazour, M. (2019). *Active and passive biomonitoring tools for microplastics assessment in two highly polluted aquatic environments : Case study of the Seine estuary and the Lebanese coast La biosurveillance active et passive pour l'étude des microplastiques dans deux environnements aquatiques pollués : L'estuaire de la Seine et le littoral libanais*. (Doctoral dissertation, Université du Littoral Côte d'Opale).

Kazour, M., & Amara, R. (2020). Is blue mussel caging an efficient method for monitoring environmental microplastics pollution? *Science of The Total Environment*, 710, 135649.

Kokalj, A. J., Kunej, U., & Skalar, T. (2018). Screening study of four environmentally relevant microplastic pollutants: uptake and effects on *Daphnia magna* and *Artemia franciscana*. *Chemosphere*, 208, 522-529.

Kor, K., & Mehdiinia, A. (2020). Neustonic microplastic pollution in the Persian Gulf. *Marine pollution bulletin*, 150, 110665.

Kuchovská, E., Morin, B., López-Cabeza, R., Barré, M., Gouffier, C., Bláhová, L., Cachot, J., Blaha, L., Gonzalez, P. (2020). Comparison of imidacloprid, propiconazole, and nanopropiconazole effects on the development, behavior, and gene expression biomarkers of the Pacific oyster (*Magallana gigas*). *Science of The Total Environment*, 142921.

Kwon, J. H., Chang, S., Hong, S. H., & Shim, W. J. (2017). Microplastics as a vector of hydrophobic contaminants: Importance of hydrophobic additives. *Integrated environmental assessment and management*, 13(3), 494-499.

< L >

Lagarde, F., Olivier, O., Zanella, M., Daniel, P., Hiard, S., & Caruso, A. (2016). Microplastic interactions with freshwater microalgae: hetero-aggregation and changes in plastic density appear strongly dependent on polymer type. *Environmental pollution*, 215, 331-339.

Larson, S. J., Capel, P. D., Goolsby, D. A., Zaugg, S. D., & Sandstrom, M. W. (1995). Relations between pesticide use and riverine flux in the Mississippi River basin. *Chemosphere*, 31(5), 3305-3321.

Law, K. L., Morét-Ferguson, S., Maximenko, N. A., Proskurowski, G., Peacock, E. E., Hafner, J., & Reddy, C. M. (2010). Plastic accumulation in the North Atlantic subtropical gyre. *Science*, 329(5996), 1185-1188.

Law, K. L., & Thompson, R. C. (2014). Microplastics in the seas. *Science*, 345(6193), 144-145.

Lacroix, C. (2014). *Impacts de perturbateurs environnementaux sur un organisme sentinelle des milieux côtiers anthropisés, la moule bleue Mytilus spp.: caractérisation génomique et écophysiological de l'adaptation au stress* (Doctoral dissertation).

Lafargue, I., Balan, S., Bonotaux, J., & Guicheney, H. (2019). Agriculture, agroalimentaire, pêche, conchyliculture : des enjeux forts pour la Charente-Maritime. Agreste Nouvelle-Aquitaine, 7p.

Laist D.W. (1997) Impacts of Marine Debris: Entanglement of Marine Life in Marine Debris Including a Comprehensive List of Species with Entanglement and Ingestion Records. In: Coe J.M., Rogers D.B. (eds) Marine Debris, *Springer Series on Environmental Management*, 99-139.

Lamine, C., Tetart, G., & Chateauraynaud, F. (2010). *Le bio comme reconfigurateur des controverses sur les pesticides et les OGM (1995-2008)*. Colloque « Pesticides » de la SFER, Lyon mars 2010, 12p.

Lango-Reynoso, F. (1999). *Détermination de la sexualité chez l'huître Crassostrea gigas (Thunberg, 1793)* (Doctoral dissertation, Université de Bretagne Occidentale).

Lanyi, K. & Dinya Z. (2003.) Photodegradation study of some triazine-type herbicides. *Microchemical Journal*. Vol. 75, pp. 1-14.

Lares, M., Ncibi, M. C., Sillanpää, M., & Sillanpää, M. (2018). Occurrence, identification, and removal of microplastic particles and fibers in conventional activated sludge process and advanced MBR technology. *Water research*, 133, 236-246.

Lasee, S., Mauricio, J., Thompson, W. A., Karnjanapiboonwong, A., Kasumba, J., Subbiah, S., Morse, A. N., Anderson, T. A. (2017). Microplastics in a freshwater environment receiving treated wastewater effluent. *Integrated environmental assessment and management*, 13(3), 528-532.

- Lattin, G. L., Moore, C. J., Zellers, A. F., Moore, S. L., & Weisberg, S. B. (2004). A comparison of neustonic plastic and zooplankton at different depths near the southern California shore. *Marine pollution bulletin*, 49(4), 291-294.
- Law, K. L., Morét-Ferguson, S., Maximenko, N. A., Proskurowski, G., Peacock, E. E., Hafner, J., & Reddy, C. M. (2010). Plastic accumulation in the North Atlantic subtropical gyre. *Science*, 329(5996), 1185-1188.
- Lazure P., Jegou A.M., (1998). 3D modelling of seasonal evolution of Loire and Gironde plumes on Biscay Bay continental shelf. *Oceanol. Acta*, 21(2), 165-177.
- Le Bihanic, F., Clérandeau, C., Cormier, B., Crebassa, J. C., Keiter, S. H., Beiras, R., Morin, B., Bégout, M.L., Cousin, X., Cachot, J. (2020). Organic contaminants sorbed to microplastics affect marine medaka fish early life stages development. *Marine pollution bulletin*, 154, 111059.
- Leboulanger, C., Rimet, F., de Lacotte, M. H., & Bérard, A. (2001). Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae. *Environment international*, 26(3), 131-135.
- Lebreton, L., & Andrady, A. (2019). Future scenarios of global plastic waste generation and disposal. *Palgrave Communications*, 5(1), 1-11.
- Lebreton, B., Rivaud, A., Picot, L., Prévost, B., Barillé, L., Sauzeau, T., Beseres Pollack, J., Lavaud, J. (2019). From ecological relevance of the ecosystem services concept to its socio-political use. The case study of intertidal bare mudflats in the Marennes-Oléron Bay, France. *Ocean & Coastal Management*, 172, 41-54.
- Lebreton, L., Slat, B., Ferrari, F., Sainte-Rose, B., Aitken, J., Marthouse, R., Hajbane, S., Cunsolo, S., Schwarz, A., Levivier, A., Noble, K., Debeljak, P., Maral, H., Schoeneich-Argent, R., Brambini, R., Reisser, J. (2018). Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic. *Scientific reports*, 8(1), 1-15.
- Lechón, Y., Sánchez-Brunete, C., & Tadeo, J. L. (1997). Influence of the laboratory incubation method on chlorotoluron and terbutryn degradation in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 951-954.
- Le Dantec, J. (1968). Ecologie et reproduction de l'huitre portugaise (*Crassostrea Angulata* LAMARCK) dans le bassin d'Arcachon et sur la rive gauche de la Gironde. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 32(3), 237-362.
- Lee, K. W., Shim, W. J., Kwon, O. Y., & Kang, J. H. (2013). Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Environmental science & technology*, 47(19), 11278-11283.
- Leet, J. K., Gall, H. E., & Sepúlveda, M. S. (2011). A review of studies on androgen and estrogen exposure in fish early life stages: effects on gene and hormonal control of sexual differentiation. *Journal of Applied Toxicology*, 31(5), 379-398.
- Le Hir, P., Kervella, S., Walker, P., & Brenon, I. (2010). Erosions, dépôts et transits sédimentaires associés dans le bassin de Marennes-Oléron. *La Houille Blanche*, (5), 65-71.
- León, V. M., García, I., González, E., Samper, R., Fernández-González, V., & Muniategui-Lorenzo, S. (2018). Potential transfer of organic pollutants from littoral plastics debris to the marine environment. *Environmental pollution*, 236, 442-453.
- Léonard, S. (2002). Réseau Régional de suivi de la qualité des eaux vis-à-vis des produits phytosanitaires. In: GRAP, R.d. (Ed.). Fédération régionale de défense contre les organismes nuisibles de Poitou-Charentes, 73p.

- Léonard, S. (2017). Dispersion des pesticides vers les eaux – Bassin de la Sèvre Niortaise et Marais Poitevin. Période 2004-2014. Agence de l'eau Loire-Bretagne, 85p.
- Lenz, R., Enders, K., & Nielsen, T. G. (2016). Microplastic exposure studies should be environmentally realistic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(29), E4121-E4122.
- Lerebours, A. (2021). Amélioration de la qualité environnementale & limitation de la toxicité de pesticides et microplastiques sur les activités conchylicoles dans les Pertuis-Charentais (Sèvre Niortaise, Charente, Seudre) : AQUAECOs Environmental project. *Rapport AQUAECOs* en cours de finalisation.
- Levet, D., Lehen, A., Jacques, S., Mouchelin, J., & Berly, A. (2008). Guide pratique des substances toxiques dans les eaux douces et littorales du bassin Seine-Normandie. *Aquascop*, 31p.
- Li, H., Wang, F., Li, J., Deng, S., & Zhang, S. (2021). Adsorption of three pesticides on polyethylene microplastics in aqueous solutions: Kinetics, isotherms, thermodynamics, and molecular dynamics simulation. *Chemosphere*, 264, 128556.
- Li, J., Yang, D., Li, L., Jabeen, K., & Shi, H. (2015). Microplastics in commercial bivalves from China. *Environmental pollution*, 207, 190-195.
- Liess, M., Schulz, R., Liess, M. D., Rother, B., & Kreuzig, R. (1999). Determination of insecticide contamination in agricultural headwater streams. *Water Research*, 33(1), 239-247.
- Liu, Z., Zhou, Z., Jiang, Q., Wang, L., Yi, Q., Qiu, L., & Song, L. (2017). The neuroendocrine immunomodulatory axis-like pathway mediated by circulating haemocytes in pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Open biology*, 7(1), 160289.
- Lobelle, D., & Cunliffe, M. (2011). Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. *Marine pollution bulletin*, 62(1), 197-200.
- Long, M., Moriceau, B., Gallinari, M., Lambert, C., Huvet, A., Raffray, J., & Soudant, P. (2015). Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: impact on their respective fates. *Marine Chemistry*, 175, 39-46.
- Lorenz, C., Roscher, L., Meyer, M. S., Hildebrandt, L., Prume, J., Löder, M. G., Primpke, S., Gerdt, G. (2019). Spatial distribution of microplastics in sediments and surface waters of the southern North Sea. *Environmental Pollution*, 252, 1719-1729.
- Loyer S., (2001). Modélisation de la production phytoplanctonique dans la zone côtière atlantique enrichie par les apports fluviaux. (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 227 p).
- Luan, L., Wang, X., Zheng, H., Liu, L., Luo, X., & Li, F. (2019). Differential toxicity of functionalized polystyrene microplastics to clams (*Meretrix meretrix*) at three key development stages of life history. *Marine pollution bulletin*, 139, 346-354.
- Luis, L. G., Ferreira, P., Fonte, E., Oliveira, M., & Guilhermino, L. (2015). Does the presence of microplastics influence the acute toxicity of chromium (VI) to early juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*)? A study with juveniles from two wild estuarine populations. *Aquatic Toxicology*, 164, 163-174.
- Luna-Acosta, A., Bustamante, P., Budzinski, H., Huet, V., & Thomas-Guyon, H. (2015). Persistent organic pollutants in a marine bivalve on the Marennes–Oléron Bay and the Gironde Estuary (French Atlantic Coast)- Part 2: Potential biological effects. *Science of the Total Environment*, 514, 511-522.

Luna-Acosta, A., Bustamante, P., Thomas-Guyon, H., Zaldibar, B., Izagirre, U., & Marigómez, I. (2017). Integrative biomarker assessment of the effects of chemically and mechanically dispersed crude oil in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Science of the Total Environment*, 598, 713-721.

Luna-Acosta, A., Rosenfeld, E., Amari, M., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante, P., Thomas-Guyon, H., 2010. First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 28:719–726.

Luo, W., Su, L., Craig, N. J., Du, F., Wu, C., & Shi, H. (2019). Comparison of microplastic pollution in different water bodies from urban creeks to coastal waters. *Environmental pollution*, 246, 174-182.

Lusher, A. (2015). Microplastics in the marine environment: distribution, interactions and effects. In *Marine anthropogenic litter* (pp. 245-307). Springer, Cham.

Lusher, A., Hollman, P., & Mendoza-Hill, J. (2017). *Microplastics in fisheries and aquaculture: status of knowledge on their occurrence and implications for aquatic organisms and food safety*. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 2017;(615).

Lusher, A. L., Burke, A., O'Connor, I., & Officer, R. (2014). Microplastic pollution in the Northeast Atlantic Ocean: validated and opportunistic sampling. *Marine pollution bulletin*, 88(1-2), 325-333.

< M >

Ma, J., Niu, X., Zhang, D., Lu, L., Ye, X., Deng, W., Li, Y., Lin, Z. (2020). High levels of microplastic pollution in aquaculture water of fish ponds in the Pearl River Estuary of Guangzhou, China. *Science of The Total Environment*, 744, 140679.

Mackay, D., & Fraser, A. (2000). Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental pollution*, 110(3), 375-391.

Maes, T., Van der Meulen, M. D., Devriese, L. I., Leslie, H. A., Huvet, A., Frère, L., Robbens, J., Vethaak, A. D. (2017). Microplastics baseline surveys at the water surface and in sediments of the North-East Atlantic. *Frontiers in Marine Science*, 4, 135.

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*). *Marine pollution bulletin*, 64(12), 2663-2670.

Mai, H., Cachot, J., Clérandeau, C., Martin, C., Mazzela, N., Gonzalez, P., & Morin, B. (2020). An environmentally realistic pesticide and copper mixture impacts embryonic development and DNA integrity of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(4), 3600-3611.

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*. *Marine Environmental Research*, 89, 1-8.

Mammo, F. K., Amoah, I. D., Gani, K. M., Pillay, L., Ratha, S. K., Bux, F., & Kumari, S. (2020). Microplastics in the environment: Interactions with microbes and chemical contaminants. *Science of The Total Environment*, 140518.

Mao, R., Lang, M., Yu, X., Wu, R., Yang, X., & Guo, X. (2020). Aging mechanism of microplastics with UV irradiation and its effects on the adsorption of heavy metals. *Journal of hazardous materials*, 393, 122515.

Références

- Marek, C., Parisot, F., Guyomard, M., Marcoux, M. A., Rondel, M., & Tramoy, R. (2020). *Lutte contre la pollution plastique en milieu marin Etat des lieux, réglementation, recensement et analyse des initiatives* (Doctoral dissertation, ADEME; ECOGEOS; LEESU).
- Margoum, C., El Moujahid, B., Martin, A., & Assoumani, A. (2015). *Optimiser l'étalonnage en laboratoire pour l'échantillonnage passif des substances hydrophobes. Conception et mise en oeuvre d'un système d'étalonnage pour les pesticides hydrophobes* (Doctoral dissertation, Irstea).
- Marot, M. F. (2011). La Charente-Maritime: une agriculture variée. Agreste Poitou-Charentes, 2p. http://www.epsilon.insee.fr/jspui/bitstream/1/21248/1/agr_PC_2011_11.pdf (consulté en Octobre, 2020).
- Marot, M. F. (2018). Filière conchyliculture. Agreste Nouvelle-Aquitaine, 4p. http://www.epsilon.insee.fr/jspui/bitstream/1/88413/1/agr_NA_filiere-conchyliculture_2018_12.pdf (consulté en Octobre, 2020).
- Marteil, L. (1976). La conchyliculture française. *Rev. Trav. Inst. pêches Marit*, 40, 149-346.
- Marteil, L. (1979). La conchyliculture française. 3. L'ostreiculture et la mytiliculture. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 43(1), 10-130.
- 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.
- Masson, D. (1997, November). La gestion de l'eau douce en Seudre. In *Les estuaires français: évolution naturelle et artificielle-Actes de colloques. Ifremer n° 22*, Paris, pp. 253–256.
- Masson D., Dubernet J.F., (2006). Etude de l'impact potentiel des eaux de rejets agricoles sur les marais aquacoles charentais, pp 93.
- Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C., & Kaminuma, T. (2001). Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environmental science & technology*, 35(2), 318-324.
- Maurel, N. (2010). *De l'introduction à l'invasion : les plantes exotiques en milieu urbain* (Doctoral dissertation, Paris, Muséum national d'histoire naturelle).
- Mazurais, D., Ernande, B., Quazuguel, P., Severe, A., Huelvan, C., Madec, L., Mouchel, O., Soudant, P., Robbens, J., Huvet, A., Zambonino-Infante, J. (2015). Evaluation of the impact of polyethylene microbeads ingestion in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Marine environmental research*, 112, 78-85.
- McDougall, D. R., Kihara, S., Reinhardt, J., Miskelly, G. M., McGillivray, D. J., & Jeffs, A. G. (2020). Biodegradable chelating agent improves the survival of early larvae for shellfish aquaculture. *Aquatic Toxicology*, 228, 105645.
- Mercogliano, R., Avio, C. G., Regoli, F., Anastasio, A., Colavita, G., & Santonicola, S. (2020). Occurrence of microplastics in commercial seafood under the perspective of the human food chain. A review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(19), 5296-5301.
- Michielssen, M. R., Michielssen, E. R., Ni, J., & Duhaime, M. B. (2016). Fate of microplastics and other small anthropogenic litter (SAL) in wastewater treatment plants depends on unit processes employed. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2(6), 1064-1073.

- Milinkovitch, T. (2011). *Stratégie de lutte contre les catastrophes pétrolières et risque environnemental associé: évaluation de la toxicité d'un dispersant en milieu côtier chez Liza sp* (Doctoral dissertation, La Rochelle Université).
- Milinkovitch, T., Bustamante, P., Huet, V., Reigner, A., Churlaud, C., & Thomas-Guyon, H. (2015a). In situ evaluation of oxidative stress and immunological parameters as ecotoxicological biomarkers in a novel sentinel species (*Mimachlamys varia*). *Aquatic Toxicology*, *161*, 170-175.
- Milinkovitch, T., Geraudie, P., Camus, L., Huet, V., & Thomas-Guyon, H. (2015b). Biomarker modulation associated with marine diesel contamination in the Iceland scallop (*Chlamys islandica*). *Environmental Science and Pollution Research*, *22*(23), 19292-19296.
- Milinkovitch, T., Godefroy, J., Théron, M., & Thomas-Guyon, H. (2011a). Toxicity of dispersant application: biomarkers responses in gills of juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*). *Environmental Pollution*, *159*(10), 2921-2928.
- Milinkovitch, T., Imbert, N., Sanchez, W., Le Floch, S., & Thomas-Guyon, H. (2013). Toxicological effects of crude oil and oil dispersant: biomarkers in the heart of the juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*). *Ecotoxicology and environmental safety*, *88*, 1-8.
- Milinkovitch, T., Ndiaye, A., Sanchez, W., Le Floch, S., & Thomas-Guyon, H. (2011b). Liver antioxidant and plasma immune responses in juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*) exposed to dispersed crude oil. *Aquatic Toxicology*, *101*(1), 155-164.
- Mille, D., & Le Moine, O. (2011). Adaptabilité des activités conchylicoles aux modifications de leur environnement : Scénarii et solutions. Le cas du bassin de Marennes-Oléron, 76p.
- Ministère de la transition écologique et solidaire (2021). <https://www.ecologie.gouv.fr/pesticides-pollutions-diffuses> (consulté en Février 2021).
- Miossec, L., Le Deuff, R. M., & Gouilletquer, P. (2009). Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). *ICES cooperative research report*, 299.
- Miramand, P., Guyot, T., & Pigeot, J. (2003). Sources et impacts potentiels des micropolluants chimiques sur un écosystème littoral exploité : l'exemple des côtes des Charente-Maritime. In *Journal de Physique IV (Proceedings)* (Vol. 108, pp. 3-6). EDP sciences.
- MolluscanEye (2020). Protéger l'environnement est plus que jamais une priorité absolue. <https://molluscan-eye.epoc.u-bordeaux.fr> (consulté en Septembre 2019).
- Momas, I., Caillard, J. F., & Lesaffre, B. (2004). Rapport de la Commission d'orientation du Plan national santé-environnement. *Environnement, Risques & Santé*, *3*(3), 141-144.
- Moore, C. J. (2008). Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. *Environmental research*, *108*(2), 131-139.
- Mortensen, S., Valero, J., Wrangle, A. L., Harketstad, L. S., Stene, R. O., Christensen, H. T., Dolmer, P., Strand, Ø. (2007). A northwards expansion of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. In *International Conference on Shellfish Restoration (ICSR), November 12-16, 2007, Vlissingen, The Netherlands*.

Références

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*. *Aquatic toxicology*, 128, 67-78.

Moussard, F. (1998). *Systèmes d'exploitation en pêche côtière ; méthode d'étude et application au cas des Pertuis* (Doctoral dissertation, ESITPA, Rouen).

MSFD Technical Subgroup on Marine Litter, 2013. Guidance on Monitoring of Marine Litter in the European Seas. A guidance document within the Common implementation Strategy for the Marine Strategy Framework Directive. Joint Research Center, European Commission, 124p.

Munaron D., (2004). *Etude des apports en pesticides et en nutriments par la Charente aux eaux cotières du Bassin de Marennes - Oléron : modélisation de la dispersion de l'atrazine dans le Bassin de Marennes Oléron*. (Doctoral dissertation, University of Pierre et Marie Curie, Paris VI, 340p).

Munaron, D.; Dubernet, J.F.; Delmas, F.; Stanisiere, J.Y. & Scribe, P. (2006). Assessment of the quantities of herbicides and nutrients brought down by the river Charente to the coast and modelling of the dispersion of atrazine in the Marennes-Oleron bay. *Cahiers De Biologie Marine*. Vol.47, pp. 85-92.

< N >

Naik, R. K., Naik, M. M., D'Costa, P. M., & Shaikh, F. (2019). Microplastics in ballast water as an emerging source and vector for harmful chemicals, antibiotics, metals, bacterial pathogens and HAB species: A potential risk to the marine environment and human health. *Marine pollution bulletin*, 149, 110525.

Napper, I. E., Bakir, A., Rowland, S. J., & Thompson, R. C. (2015). Characterisation, quantity and sorptive properties of microplastics extracted from cosmetics. *Marine pollution bulletin*, 99(1-2), 178-185.

Narancic, T., Verstichel, S., Reddy Chaganti, S., Morales-Gamez, L., Kenny, S. T., De Wilde, B., Padamati, R.B., O'Connor, K. E. (2018). Biodegradable plastic blends create new possibilities for end-of-life management of plastics but they are not a panacea for plastic pollution. *Environmental science & technology*, 52(18), 10441-10452.

Nations-Unies – Questions thématiques – La population. <https://www.un.org/fr/sections/issues-depth/population/index.html> (accès en Avril 2021).

Nelms, S. E., Barnett, J., Brownlow, A., Davison, N. J., Deaville, R., Galloway, T. S., Lindeque, P.K., Santillo, D., Godley, B. J. (2019). Microplastics in marine mammals stranded around the British coast: ubiquitous but transitory? *Scientific Reports*, 9(1), 1-8.

Nelms, S. E., Galloway, T. S., Godley, B. J., Jarvis, D. S., & Lindeque, P. K. (2018). Investigating microplastic trophic transfer in marine top predators. *Environmental Pollution*, 238, 999-1007.

Nelson, T. C. (1928). Relation of spawning of the oyster to temperature. *Ecology*, 9(2), 145-154.

NF ISO 17244, 2015. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité d'échantillons aqueux sur le développement embryo-larvaire de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et de la moule (*Mytilus edulis* ou *Mytilus galloprovincialis*).

Nogueira, D. J., Mattos, J. J., Dybas, P. R., Flores-Nunes, F., Sasaki, S. T., Taniguchi, S., Schmidt, E.C., Bouzon, Z.L., Bizego, M.C., Melo, C.M.R., Toledo-Silva, G., Bairy, A.C.D., (2017). Effects of phenanthrene on early development of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1789). *Aquatic Toxicology*, 191, 50-61.

Norén, F. (2007). *Small Plastic Particles in Coastal Swedish Waters*. KIMO Sweden. Available online at: <http://www.kimointernational.org/>

Nørgaard, K. B., & Cedergreen, N. (2010). Pesticide cocktails can interact synergistically on aquatic crustaceans. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(4), 957-967.

Noyes, P.D., Lema, S.C., 2015. Heating up the environmental context of chemical pollution: ecotoxicology in a changing global climate. *Curr. Zool.* 61, 614–616.

< O >

O'Connor, T. P. (2002). National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. *Marine Environmental Research*, 53(2), 117-143.

Okamura, H., Aoyama, I., Liu, D., Maguire, R. J., Pacepavicius, G. J., & Lau, Y. L. (2000). Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. *Water Research*, 34(14), 3523-3530.

OIE, 2008. Suspected Herpesvirus OsHV-1 Frequently Associated with *Vibrio splendidus*, France. http://www.oie.int/wahis/reports/en_imm_000008265_20090727_142743.pdf (accessed October 2020).

OSPAR Commission (2010). *Guideline for Monitoring Marine Litter on the Beaches in the OSPAR Maritime Area*. London (84 pp.).

Ostle, C., Thompson, R. C., Broughton, D., Gregory, L., Wootton, M., & Johns, D. G. (2019). The rise in ocean plastics evidenced from a 60-year time series. *Nature communications*, 10(1), 1-6.

< P >

Paço, A., Jacinto, J., da Costa, J. P., Santos, P. S., Vitorino, R., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2019). Biotechnological tools for the effective management of plastics in the environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 49(5), 410-441.

Pampanin, D. M., Volpato, E., Marangon, I., & Nasci, C. (2005). Physiological measurements from native and transplanted mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in the canals of Venice. Survival in air and condition index. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 140(1), 41-52.

Pankkonen, P. (2020). Urban stormwater microplastics - Characteristics and removal using a developed filtration system, Master's thesis, Aalto University, Helsinki, Finland, 1-58.

Pannetier, P., Cachot, J., Clérandeau, C., Faure, F., Van Arkel, K., de Alencastro, L. F., Levasseur, C., Sciacca, F., Bourgeois, J.P., Morin, B. (2019). Toxicity assessment of pollutants sorbed on environmental sample microplastics collected on beaches: Part I-adverse effects on fish cell line. *Environmental Pollution*, 248, 1088-1097.

Pannetier, P., Morin, B., Le Bihanic, F., Dubreil, L., Clérandeau, C., Chouvellon, F., Van Arkel, K., Danion, M., Cachot, J. (2020). Environmental samples of microplastics induce significant toxic effects in fish larvae. *Environment international*, 134, 105047.

Paris, B., Doise, S., Fillâtre, J., Cabeu, I., Drouineau, A., Denegri, T., Fatnassi, H., Bresch, C., Poncet, C. (2019). OTELHO: Vers une horticulture connectée, suivi des macroorganismes pour réduire les pesticides. *Innovations Agronomiques*, 76, 87-102.

- Parliament, E. (2009). Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. *Official Journal of the European Union*, 309, 71-86.
- Paul-Pont, I., Tallec, K., Gonzalez-Fernandez, C., Lambert, C., Vincent, D., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J.L., Brotons, G., Lagarde, F., Fabioux, C., Soudant, P., Huvet, A. (2018). Constraints and priorities for conducting experimental exposures of marine organisms to microplastics. *Frontiers in Marine Science*, 5, 252.
- Paz, R., Monzón, M., Vega, G., Díaz, N., & Pestana, D. (2020). Use of Banana Crop Wastes to Develop Products in the Aquaculture and Plastic Sectors. In *Agricultural, Forestry and Bioindustry Biotechnology and Biodiscovery* (pp. 259-270). Springer, Cham.
- Pépin J-F, Benabdelmouna A, Degremont L, Guesdon S, Le Moine O, Morga B, Bierne N, Travers M-A, Robert S, Soletchnik P (2017) Mortalités de moules bleues dans les secteurs mytilicoles charentais et vendéens: description et facteurs liés – MORBLEU. *Ifremer*. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00391/50288/>
- Pépin, J.F., A. Riou et T. Renault. 2008. Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 149: 269-276.
- Pépin, J. F., Soletchnik, P., & Robert, S. (2014). Mortalités massives de l’Huître creuse. Synthèse-Rapport final des études menées sur les mortalités de naissains d’huîtres creuses *C. gigas* sur le littoral charentais pour la période de 2007 à 2012. *Ifremer*, 49p.
- Pesce, S., Lissalde, S., Lavieille, D., Margoum, C., Mazzella, N., Roubeix, V., & Montuelle, B. (2010). Evaluation of single and joint toxic effects of diuron and its main metabolites on natural phototrophic biofilms using a pollution-induced community tolerance (PICT) approach. *Aquatic Toxicology*, 99(4), 492-499.
- Phuong, N. N. (2018). *Développements analytiques pour la caractérisation et la quantification de la contamination en microplastiques des matrices sédimentaires et biologiques : Application aux zones conchylicoles des Pays de la Loire*. (Doctoral dissertation, UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques. EA 2160 MMS-Mer, Molécules, Santé).
- Phuong, N. N., Poirier, L., Lagarde, F., Kamari, A., & Zalouk-Vergnoux, A. (2018a). Microplastic abundance and characteristics in French Atlantic coastal sediments using a new extraction method. *Environmental Pollution*, 243, 228-237.
- Phuong, N. N., Poirier, L., Pham, Q. T., Lagarde, F., & Zalouk-Vergnoux, A. (2018b). Factors influencing the microplastic contamination of bivalves from the French Atlantic coast: location, season and/or mode of life? *Marine Pollution Bulletin*, 129(2), 664-674.
- Phuong, N. N., Zalouk-Vergnoux, A., Kamari, A., Mouneyrac, C., Amiard, F., Poirier, L., & Lagarde, F. (2018c). Quantification and characterization of microplastics in blue mussels (*Mytilus edulis*): protocol setup and preliminary data on the contamination of the French Atlantic coast. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(7), 6135-6144.
- Pibot A., Claro F. (2012) Impacts écologiques des déchets marins. Contribution thématique au Plan d’Action pour le Milieu Marin – Manche – Mer du Nord, 13p.
- Pichot Y. & Barret J., (2007). Mortalités anormales d’huîtres creuses *Crassostrea gigas* dans les étangs de Thau, d’Ingril et de Leucate - Printemps 2007. Rapport LER-LR/DIDAM 34-30, 24p.

Picó, Y., & Barceló, D. (2019). Analysis and prevention of microplastics pollution in water: current perspectives and future directions. *ACS omega*, 4(4), 6709-6719.

Pitt, J. A., Kozal, J. S., Jayasundara, N., Massarsky, A., Trevisan, R., Geitner, N., Wiesner, M., Levin, E.D., Di Giulio, R. T. (2018). Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic toxicology*, 194, 185-194.

PlasticsEurope. Plastics-The Facts 2013 *An Analysis of European Latest Plastics Production, Demand and Waste Data*, 2013. (38pp.).

PlasticsEurope. (2018). *Plastics-the Facts 2018 An analysis of European plastics production, demand and waste data*. (60pp.).

PlasticsEurope. (2020). Plastics - the facts 2020: *an analysis of European plastics production, demand and waste data*. PlasticsEurope Internal Report 4312 (64pp.).

Polsenaere, P., Soletchnik, P., Le Moine, O., Gohin, F., Robert, S., Pépin, J. F., Stanisière, J.Y., Dumas, F., Béchemin, C., Gouletquer, P. (2017). Potential environmental drivers of a regional blue mussel mass mortality event (winter of 2014, Breton Sound, France). *Journal of Sea Research*, 123, 39-50.

Pouvreau, S., & Lepennec, M. (2006). Ecophysiologie de la reproduction chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. *Ifremer*, 42p.

Prata, J. C. (2018). Microplastics in wastewater: State of the knowledge on sources, fate and solutions. *Marine pollution bulletin*, 129(1), 262-265.

Prata, J. C., Reis, V., da Costa, J. P., Mouneyrac, C., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2021). Contamination issues as a challenge in quality control and quality assurance in microplastics analytics. *Journal of Hazardous Materials*, 403, 123660.

Prou, J., Pouvreau, S., & Renaud, V. (1994). Estimation de la biomasse d'huîtres non cultivées dans le bassin de Marennes-Oléron. *Ifremer*, 29p.

< Q >

Qian, L., Qi, S., Cao, F., Zhang, J., Zhao, F., Li, C., & Wang, C. (2018). Toxic effects of boscalid on the growth, photosynthesis, antioxidant system and metabolism of *Chlorella vulgaris*. *Environmental pollution*, 242, 171-181.

Qian, L., Qi, S., Wang, Z., Magnuson, J. T., Volz, D. C., Schlenk, D., Jiang, J., Wang, C. (2021). Environmentally relevant concentrations of boscalid exposure affects the neurobehavioral response of zebrafish by disrupting visual and nervous systems. *Journal of Hazardous Materials*, 404, 124083.

Qian, L., Zhang, J., Chen, X., Qi, S., Wu, P., Wang, C., & Wang, C. (2019). Toxic effects of boscalid in adult zebrafish (*Danio rerio*) on carbohydrate and lipid metabolism. *Environmental Pollution*, 247, 775-782.

Qu, X., Su, L., Li, H., Liang, M., & Shi, H. (2018). Assessing the relationship between the abundance and properties of microplastics in water and in mussels. *Science of The Total Environment*, 621, 679-686.

Quiniou, F. (2005). *Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux : bio-essai développement embryon-larvaire de bivalve*. Méthodes d'analyse en milieu marin. *Ifremer*, 24p.

Quiniou F, His E, Delesmont R, Caisey X, 2005, Bio- indicateur de la toxicite potentielle de milieux aqueux : bio-essai, Editions Ifremer, INRA Editions, RD10, F-78026 Versailles Cedex, ISSN 1637-1844, ISBN 2-84433-146-7.

Quiniou, F., Toularastel, F., & Fevre-Lehoerff, L. (1991). Utilisation des bioessais sur les embryons de bivalves dans le cadre d'une surveillance des effets biologiques. *Ifremer*, 19p.

< R >

Rabalais, N. N., Turner, R. E., Díaz, R. J., & Justic, D. (2009). Global change and eutrophication of coastal waters. *ICES Journal of Marine Science*, 66(7), 1528-1537.

Ratier, A., Lopes, C., Multari, G., Mazerolles, V., Carpentier, P., & Charles, S. (2020). A new on-line tool for the calculation of bioaccumulation factors of active substances within living organisms: MOSAIC Bioacc. *bioRxiv*, 20p.

Recema, Réseau d’Evaluation Complémentaire de l’Etat de l’Eau et des Milieux aquatiques du bassin de la Charente et de ses affluents. EPTB Charente & Agence de l’eau Adour-Garonne. 2017, 55p.

Redondo-Hasselerharm, P. E., Falahudin, D., Peeters, E. T., & Koelmans, A. A. (2018). Microplastic effect thresholds for freshwater benthic macroinvertebrates. *Environmental science & technology*, 52(4), 2278-2286.

Reguera, P., Viñas, L., & Gago, J. (2019). Microplastics in wild mussels (*Mytilus spp.*) from the north coast of Spain. *Scientia Marina*, 83(4), 337-347.

Rehse, S., Kloas, W., & Zarfl, C. (2016). Short-term exposure with high concentrations of pristine microplastic particles leads to immobilisation of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 153, 91-99.

Reise, K., Gollasch, S., & Wolff, W. J. (1998). Introduced marine species of the North Sea coasts. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 52(3), 219-234.

Reisser, J., Slat, B., Noble, K., Du Plessis, K., Epp, M., Proietti, M., de Sonnevile, J., Becker, T., Pattiaratchi, C. (2015). The vertical distribution of buoyant plastics at sea: an observational study in the North Atlantic Gyre. *Biogeosciences*, 12(4), 1249-1256.

Renault, T. (2011). Effects of pesticides on marine bivalves: what do we know and what do we need to know. *Pesticides in the Modern World—Risks and Benefits*, 228-240.

Revel, M., Châtel, A., Perrein-Ettajani, H., Bruneau, M., Akcha, F., Sussarellu, R., Rouxel, J., Costil, K., Decottignies, P., Cognie, B., Lagarde, F., Mouneyrac, C. (2020). Realistic environmental exposure to microplastics does not induce biological effects in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine pollution bulletin*, 150, 110627.

Ribeiro, F., Garcia, A. R., Pereira, B. P., Fonseca, M., Mestre, N. C., Fonseca, T. G., Iharco, L.M., Bebianno, M. J. (2017). Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. *Marine pollution bulletin*, 122(1-2), 379-391.

Ribeiro, F., O'Brien, J. W., Galloway, T., & Thomas, K. V. (2019). Accumulation and fate of nano-and microplastics and associated contaminants in organisms. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 111, 139-147.

Ricart, M., Guasch, H., Barceló, D., Brix, R., Conceição, M. H., Geiszinger, A., de Alda, M.J.L., Lopez-Doval, J.C., Munoz, I., Postigo, C., Romaní, A. M., Villagrana, M., Sabater, S. (2010). Primary and complex stressors in polluted Mediterranean rivers: pesticide effects on biological communities. *Journal of Hydrology*, 383(1-2), 52-61.

- Rico-Villa, B., Bernard, I., Robert, R., & Pouvreau, S. (2010). A Dynamic Energy Budget (DEB) growth model for Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 305(1-4), 84-94.
- Rios, L. M., Moore, C., & Jones, P. R. (2007). Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. *Marine pollution bulletin*, 54(8), 1230-1237.
- Rist, S., Baun, A., Almeda, R., & Hartmann, N. B. (2019). Ingestion and effects of micro-and nanoplastics in blue mussel (*Mytilus edulis*) larvae. *Marine pollution bulletin*, 140, 423-430.
- Rocher L. (2008) Les contradictions de la gestion intégrée des déchets urbains : l'incinération entre valorisation énergétique et refus social. *Flux*, 74, 22-29.
- Rochman, C. M. (2016). Ecologically relevant data are policy-relevant data. *Science*, 352(6290), 1172-1172.
- Rochman, C. M., Browne, M. A., Halpern, B. S., Hentschel, B. T., Hoh, E., Karapanagioti, H. K., Rios-Mendoza, L.M., Takada, H., Teh, S., Thompson, R. C. (2013). Classify plastic waste as hazardous. *Nature*, 494(7436), 169-171.
- Rodrigues, E. T., Alpendurada, M. F., Ramos, F., & Pardal, M. Â. (2018). Environmental and human health risk indicators for agricultural pesticides in estuaries. *Ecotoxicology and environmental safety*, 150, 224-231.
- Rodrigues, J. P., Duarte, A. C., Santos-Echeandía, J., & Rocha-Santos, T. (2019). Significance of interactions between microplastics and POPs in the marine environment: a critical overview. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 111, 252-260.
- Rostagno, B., Violleau, A., Brun, C., Dietrich, P., Fillon, A., Gouletquer, P., Guichet, R., Kantin, R., Legay, D., Loubersac, L., Masson, D., Rocher, G., Ryckaert, M., Thomas, G., Fichet, D., Guyot, T., Miramand, P., Pigeot, J., Seguignes, M. (1999). Qualité des eaux littorales des Pertuis Charentais : Bilan et diagnostic. *Ifremer*, 133p.
- Rousseau, B., & Guyard, A. (2014). Les enjeux de l'eau. *Pour*, (3), 237-246.
- Rundlöf, M., Andersson, G. K., Bommarco, R., Fries, I., Hederström, V., Herbertsson, L., Jonsson, O., Klatt, B.K., Pedersen, T.R., Yourstone, J., Smith, H. G. (2015). Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature*, 521(7550), 77-80.
- Rutherford, A. W., & Krieger-Liszka, A. (2001). Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends in biochemical sciences*, 26(11), 648-653.
- < S >
- Saglio, P., Bretaud, S., Rivot, E., & Olsén, K. H. (2003). Chemobehavioral changes induced by short-term exposures to prochloraz, nicosulfuron, and carbofuran in goldfish. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 45(4), 515-524.
- Saint-Béat, B., Dupuy, C., Bocher, P., Chalumeau, J., De Crignis, M., Fontaine, C. et al. (2013). Key features of intertidal food webs that support migratory shorebirds. *PLoS ONE* 8, e76739.
- Sanchez-Vidal, A., Thompson, R. C., Canals, M., & de Haan, W. P. (2018). The imprint of microfibres in southern European deep seas. *PloS one*, 13(11), e0207033.
- Sanco, DG. (2005). Review report for the active substance Chlorotoluron. Finalised in the Standing Committee in the Food Chain and Animal Health at its meeting on 15 February 2005 in view of the inclusion of

Chlortoluron in Annex I of Directive 91/414/EEC. European Commission - General Health & Consumer Protection - Unit E1 Plant Health, SANCO/4329/200 final.

http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list_chlortoluron.pdf

Santana, M. F. M., Ascer, L. G., Custódio, M. R., Moreira, F. T., & Turra, A. (2016). Microplastic contamination in natural mussel beds from a Brazilian urbanized coastal region: rapid evaluation through bioassessment. *Marine Pollution Bulletin*, 106(1-2), 183-189.

Santos, A. D. O., Nascimento, M. T. L., e Sá, M. D. O., Bila, D. M., Neto, B. J., Pereira, R., & Vieira, M. N. (2015). Marine Pollution: The Problematic of Microplastics. *Journal of Marine Science. Research & Development*, 5(3), 1.

Santos, L. L., Miranda, D., Hatje, V., Albergaria-Barbosa, A. C. R., & Leonel, J. (2020). PCBs occurrence in marine bivalves and fish from Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. *Marine pollution bulletin*, 154, 111070.

Santos, M., Serrano, N., Rubio, A., Perez, C., Louzao, M., Korta, M., Chifflet, M., 2019. Enfoque ecosistémico para la investigación pesquera. ECOPEs. Informe para Eusko Jaurlaritza – Gobierno Vasco, Dirección de pesca y acuicultura. (P45).

Sargent, C. J., Bowman, J. C., & Zhou, J. L. (2000). Levels of antifoulant irgarol 1051 in the Conwy Marina, North Wales. *Chemosphere*, 41(11), 1755-1760.

Schäfer, R. B., Liess, M., Altenburger, R., Filser, J., Hollert, H., Roß-Nickoll, M., Schaffer, A., Scheringer, M. (2019). Future pesticide risk assessment: narrowing the gap between intention and reality. *Environmental Sciences Europe*, 31(1), 21.

Schillinger, S. (1996) *Dynamique sédimentaire des Pertuis charentais*. Université de Bretagne Occidentale.

Schoof, R. A., & DeNike, J. (2017). Microplastics in the context of regulation of commercial shellfish aquaculture operations. *Integrated environmental assessment and management*, 13(3), 522-527.

Scopetani, C., Esterhuizen-Londt, M., Chelazzi, D., Cincinelli, A., Setälä, H., & Pflugmacher, S. (2020). Self-contamination from clothing in microplastics research. *Ecotoxicology and environmental safety*, 189, 110036.

Segarra, A., Pepin, J.F., Arzul, I., Morga, B., Faury, N. & Renault, T. 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Vir Res.* 153: 92-95.

Seguin, F., Leboulanger, C., Rimet, F., Druart, J. C., & Bérard, A. (2001). Effects of atrazine and nicosulfuron on phytoplankton in systems of increasing complexity. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 40(2), 198-208.

Sgolastra, F., Medrzycki, P., Bortolotti, L., Maini, S., Porrini, C., Simon-Delso, N., & Bosch, J. (2020). Bees and pesticide regulation: lessons from the neonicotinoid experience. *Biological Conservation*, 241, 108356.

Sharma, S., & Chatterjee, S. (2017). Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(27), 21530-21547.

Shen, M., Song, B., Zhu, Y., Zeng, G., Zhang, Y., Yang, Y., Wen, X., Yi, H. (2020). Removal of microplastics via drinking water treatment: Current knowledge and future directions. *Chemosphere*, 251, 126612.

- Silva, C. J., Silva, A. L. P., Campos, D., Machado, A. L., Pestana, J. L., & Gravato, C. (2020). Oxidative damage and decreased aerobic energy production due to ingestion of polyethylene microplastics by *Chironomus riparius* (Diptera) larvae. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123775.
- Silva, J. D., Barletta, M., Lima, A. R., & Ferreira, G. V. (2018). Use of resources and microplastic contamination throughout the life cycle of grunts (*Haemulidae*) in a tropical estuary. *Environmental Pollution*, 242, 1010-1021.
- Sjollema, S. B., Redondo-Hasselerharm, P., Leslie, H. A., Kraak, M. H., & Vethaak, A. D. (2016). Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth? *Aquatic toxicology*, 170, 259-261.
- Smalling, K. L., & Orlando, J. L. (2011). *Occurrence of pesticides in surface water and sediments from three Central California coastal watersheds, 2008-09*. US Geological Survey Data Series 600, 70p.
- Soletchnik P., (2002). Evolution à moyen terme d'un écosystème estuarien : le bassin de Marennes- Oléron. In : *Rapport Ifremer*. Journées du Département. Thème : Ecosystème. Direction des Ressources Vivantes. Département des Ressources Aquacoles, La Tremblade 17-18 juin 2002 : 6p.
- Soletchnik, P., Bouchet, V., Malestroit, P., Seugnet, J. L., Blouin, F., Radford-Knoery, J., Burgeot, T., Sauriau, P. G. (2005a). Mortalité de *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes Oléron. Etude physico chimique du sédiment. Etude du modèle de mortalité plat-table de *C. gigas* dans le bassin de Marennes Oléron. Etude Dynamo du projet MOREST. *Ifremer*, 29p.
- Soletchnik, P., Bouquet, A. L., & Mille, D. (2018). Flash Info Maline 2008-2018, ten years already... of communication on the mortalities of oysters (*Crassostrea gigas*) and mussels (*Mytilus edulis*) in the Pertuis Charentais. *Ifremer report*, pp18.
- Soletchnik, P., Geairon, P., Le Moine, O., & Robert, S. (2012). Estimation des stocks sauvages d'huîtres creuses dans les pertuis charentais en 2010. *Ifremer ODE/LER/LERPC*, 33p.
- Soletchnik P., Lambert C., Costil K., (2005b). Summer Mortality of *Crassostrea gigas* (Thunberg) in relation to environmental rearing conditions. *Journal of Shellfish Research* 24, 197-208.
- Soletchnik, P., Le Moine, O., & Robert, S. (2008). Les mortalités d'huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) dans les Pertuis Charentais. Résultats de l'année 2008. *Ifremer*, 63p.
- Soletchnik, P., Polsenaere, P., Le Moine, O., Guesdon, S., Béchemin, C., 2015. Relations entreapports terrigènes et conchyliculture dans les Pertuis Charentais. *Ifremer*, pp. 1-53.
- Song, Y. K., Hong, S. H., Jang, M., Han, G. M., & Shim, W. J. (2015). Occurrence and distribution of microplastics in the sea surface microlayer in Jinhae Bay, South Korea. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 69(3), 279-287.
- Soulard, C. T. (2005). Les agriculteurs et la pollution des eaux. Proposition d'une géographie des pratiques. *Natures Sciences Sociétés*, 13(2), 154-164.
- Sørensen, S. R., Bending, G. D., Jacobsen, C. S., Walker, A., & Aamand, J. (2003). Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. *FEMS microbiology ecology*, 45(1), 1-11.
- Stachowski-Haberkorn, S. (2008). *Méthodes d'évaluation de l'impact de pesticides sur le phytoplancton marin et le naissain d'huître creuse* (Doctoral dissertation, Université de Bretagne occidentale-Brest).

- Stachowski-Haberkorn, S., Becker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Coroller, L., & De La Broise, D. (2008). Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an *in situ* microcosm experiment. *Aquatic toxicology*, 89(4), 232-241.
- Steensgaard, I. M., Syberg, K., Rist, S., Hartmann, N. B., Boldrin, A., & Hansen, S. F. (2017). From macro- to microplastics—Analysis of EU regulation along the life cycle of plastic bags. *Environmental Pollution*, 224, 289-299.
- Stehle, S., & Schulz, R. (2015). Pesticide authorization in the EU—environment unprotected? *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 19632-19647.
- Steinman, A. D., Scott, J., Green, L., Partridge, C., Oudsema, M., Hassett, M., Kindervater, E., Rediske, R. R. (2020). Persistent organic pollutants, metals, and the bacterial community composition associated with microplastics in Muskegon Lake (MI). *Journal of Great Lakes Research*, 46(5), 1444-1458.
- Stenzel, H. B. (1947). Nomenclatural synopsis of supraspecific groups of the family Ostreidae (*Pelecypoda*, *Mollusca*). *Journal of Paleontology*, 165-185.
- Strady E., (2010). Mécanismes biogéochimiques de la contamination des huîtres *Crassostrea gigas* en Cadmium en baie de Marennes Oléron. (Doctoral dissertation, University of Bordeaux, 293p.).
- Strungaru, S. A., Jijie, R., Nicoara, M., Plavan, G., & Faggio, C. (2019). Micro-(nano) plastics in freshwater ecosystems: abundance, toxicological impact and quantification methodology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 110, 116-128.
- Suaria, G., Avio, C. G., Mineo, A., Lattin, G. L., Magaldi, M. G., Belmonte, G., Moore, C.J., Regoli, F., Aliani, S. (2016). The Mediterranean Plastic Soup: synthetic polymers in Mediterranean surface waters. *Scientific reports*, 6(1), 1-10.
- Suhrhoff, T. J., & Scholz-Böttcher, B. M. (2016). Qualitative impact of salinity, UV radiation and turbulence on leaching of organic plastic additives from four common plastics—A lab experiment. *Marine pollution bulletin*, 102(1), 84-94.
- Summers, S., Henry, T., & Gutierrez, T. (2018). Agglomeration of nano- and microplastic particles in seawater by autochthonous and de novo-produced sources of exopolymeric substances. *Marine pollution bulletin*, 130, 258-267.
- Sussarellu, R., Suquet, M., Thomas, Y., Lambert, C., Fabioux, C., Pernet, M. E. J., Le Goic, N., Quillien, V., Mingant, C., Epelboin, Y., Corporeau, C., Guyomarch, J., Robbens, J., Paul-Pont, I., Soudant, P., Huvet, A. (2016). Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(9), 2430-2435.
- < T >
- Talleg, K. (2019). *Impacts des nanoplastiques et microplastiques sur les premiers stades de vie (gamètes, embryons, larves) de l'huître creuse Crassostrea gigas* (Doctoral dissertation, Brest).
- Talleg, K., Huvet, A., Di Poi, C., González-Fernández, C., Lambert, C., Petton, B., Le Goic, N., Berchel, M., Soudant, P., Paul-Pont, I. (2018). Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos. *Environmental Pollution*, 242, 1226-1235.
- Talleg, K., Paul-Pont, I., Petton, B., Alunno-Bruscia, M., Bourdon, C., Bernardini, I., Boulais, M., Lambert, C., Quéré, C., Bideau, A., Le Goic, N., Cassone, A-L., Le Grand, F., Fabioux, C., Soudant, P., Huvet, A. (2021).

Amino-nanopolystyrene exposures of oyster (*Crassostrea gigas*) embryos induced no apparent intergenerational effects. *Nanotoxicology*, 1-17.

Teng, J., Wang, Q., Ran, W., Wu, D., Liu, Y., Sun, S., Liu, H., Cao, R., Zhao, J. (2019). Microplastic in cultured oysters from different coastal areas of China. *Science of the total environment*, 653, 1282-1292.

Teng, J., Zhao, J., Zhu, X., Shan, E., Zhang, C., Zhang, W., & Wang, Q. (2020). Toxic effects of exposure to microplastics with environmentally relevant shapes and concentrations: Accumulation, energy metabolism and tissue damage in oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental Pollution*, 269, 116169.

Teng, J., Zhao, J., Zhu, X., Shan, E., Zhang, C., Zhang, W., & Wang, Q. (2021). Toxic effects of exposure to microplastics with environmentally relevant shapes and concentrations: Accumulation, energy metabolism and tissue damage in oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental Pollution*, 269, 116169.

TEO – Bac à marée – 2020. Indicateur connecté de l'état écologique des littoraux point d'apport volontaire des déchets marins (suivi 2020). Communication personnelle.

Teuten, E. L., Rowland, S. J., Galloway, T. S., & Thompson, R. C. (2007). Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. *Environmental science & technology*, 41(22), 7759-7764.

Teuten, E. L., Saquing, J. M., Knappe, D. R., Barlaz, M. A., Jonsson, S., Björn, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., Galloway, T.S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P.H., Tana, T.S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Akkavong, K., Ogata, Y., Hirai, H., Iwasa, S., Mizukawa, K., Hagino, Y., Imamura, A., Saha, M., Takada, H. (2009). Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2027-2045.

Thomas, K. V., Blake, S. J., & Waldock, M. J. (2000). Antifouling paint booster biocide contamination in UK marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 40(9), 739-745.

Thomas, M., Jon, B., Craig, S., Edward, R., Ruth, H., John, B., Dick, V.A., Heather, L.A., Matthew, S. (2020). The world is your oyster: low-dose, long-term microplastic exposure of juvenile oysters. *Helixyon*, 6(1), e03103.

Thomas, Y., Cassou, C., Gernez, P., & Pouvreau, S. (2018). Oysters as sentinels of climate variability and climate change in coastal ecosystems. *Environmental Research Letters*, 13(10), 104009.

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). *Developmental & Comparative Immunology*, 33(5), 653-659.

Thompson, R. C. (2015). Microplastics in the marine environment: sources, consequences and solutions. In *Marine anthropogenic litter* (pp. 185-200). Springer, Cham.

Thompson, R. C., Olsen, Y., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J., John, A. W., McGonigle, D., Russell, A. E. (2004). Lost at sea: where is all the plastic? *Science (Washington)*, 304(5672), 838.

Tiberghien, F. (2012) « Eau et agriculture : problématiques actuelles », *Pour*, 213, p. 37-43.

Tong, H., Jiang, Q., Hu, X., & Zhong, X. (2020). Occurrence and identification of microplastics in tap water from China. *Chemosphere*, 252, 126493.

Torre, A., & Caron, A. (2005). Réflexions sur les dimensions négatives de la proximité : le cas des conflits d'usage et de voisinage. *Économie et institutions*, (6-7), 183-219.

Toulhoat L., 2008, *Eléments de compréhension des Stratégies de captage naturel de l'Huître creuse (Crassostrea gigas) des Ostréiculteurs de Charente-Maritime*, Mémoire de fin d'Etudes, Ifremer – ISARA-Lyon, 89p.

Tran D, Ciret P, Ciutat A, Durrieu G, Massabuau J-C (2003) Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 116–122.

Tran, D., Ciutat, A., Mat, A., Massabuau, J. C., Hégaret, H., Lambert, C., Le Goic, N., Soudant, P. (2015). The toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* disrupts daily rhythmic activities at gene transcription, physiological and behavioral levels in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*, 158, 41-49.

Tran, D., Haberkorn, H., Soudant, P., Ciret, P., & Massabuau, J. C. (2010). Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture*, 298(3-4), 338-345.

Turner, A., & Holmes, L. A. (2015). Adsorption of trace metals by microplastic pellets in fresh water. *Environmental chemistry*, 12(5), 600-610.

< U >

Underwood, G.J.C., and Kromkamp, J. (1999) Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. In Adv Ecol Res. Nedwell, D.B., and Raffaelli, D.G. (eds): Academic Press, pp. 93-153.

UNEP, GRID-Arendal, 2016. Marine Litter Vital Graphics. United Nations Environment Programme and Grid-Arendal. <https://www.grida.no/publications/60>

US-EPA (2003). Pesticide Fact Sheet. Name of chemical: Boscalid. US-EPA. July 2003.
http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-128008_01-Jul-03.pdf.

US-EPA (2010). Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for Boscalid. New Use on Rapeseed, including Canola (Seed Treatment). US-EPA. December, 2010.
http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-128008_23-Dec-10_a.pdf.

US-EPA (2011). EPI Suite, v.4.10, EPA's office of pollution prevention toxics and Syracuse Research Corporation (SRC).

< V >

Valiente Moro, C., Bricheux, G., Portelli, C., & Bohatier, J. (2012). Comparative effects of the herbicides chlortoluron and mesotrione on freshwater microalgae. *Environmental toxicology and chemistry*, 31(4), 778-786.

Van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandegehuchte, M. B., & Janssen, C. R. (2015). Microplastics are taken up by mussels (*Mytilus edulis*) and lugworms (*Arenicola marina*) living in natural habitats. *Environmental pollution*, 199, 10-17.

Van Cauwenberghe, L., & Janssen, C. R. (2014). Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environmental pollution*, 193, 65-70.

Vargha, M.; Takats, Z. & Marialigeti, K. (2005). Degradation of atrazine in a laboratory scale model system with Danube river sediment. *Water. Research*. Vol.39, pp. 1560-1568.

Vázquez-Rowe, I., Ita-Nagy, D., & Kahhat, R. (2021). Microplastics in fisheries and aquaculture: implications to food sustainability and safety. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 100464.

Vogeler, S., Bean, T. P., Lyons, B. P., & Galloway, T. S. (2016). Dynamics of nuclear receptor gene expression during Pacific oyster development. *BMC developmental biology*, *16*(1), 1-13.

Vu, H. T., Keough, M. J., Long, S. M., & Pettigrove, V. J. (2016). Effects of the boscalid fungicide Filan® on the marine amphipod *Allorchestes compressa* at environmentally relevant concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *35*(5), 1130-1137.

< W >

Waite, H. R., Donnelly, M. J., & Walters, L. J. (2018). Quantity and types of microplastics in the organic tissues of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and Atlantic mud crab *Panopeus herbstii* from a Florida estuary. *Marine pollution bulletin*, *129*(1), 179-185.

Wallace, W. G., & Luoma, S. N. (2003). Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Marine Ecology Progress Series*, *257*, 125-137.

Wan, Z., Wang, C., Zhou, J., Shen, M., Wang, X., Fu, Z., & Jin, Y. (2019). Effects of polystyrene microplastics on the composition of the microbiome and metabolism in larval zebrafish. *Chemosphere*, *217*, 646-658.

Wang, F., Gao, J., Zhai, W., Liu, D., Zhou, Z., & Wang, P. (2020a). The influence of polyethylene microplastics on pesticide residue and degradation in the aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, *394*, 122517.

Wang, H., Meng, Z., Liu, F., Zhou, L., Su, M., Meng, Y., Zhang, S., Liao, X., Cao, Z., Lu, H. (2020b). Characterization of boscalid-induced oxidative stress and neurodevelopmental toxicity in zebrafish embryos. *Chemosphere*, *238*, 124753.

Wang, J., Chrisoffersen, K., Buck, S., & Tao, Y. (2007). The Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in the Isefjord, Denmark. Roskilde University, Department of Environmental, Social and Spacial Change, Roskilde, p. 49.

Wang, J., Li, Y., Lu, L., Zheng, M., Zhang, X., Tian, H., Wang, W., Ru, S. (2019). Polystyrene microplastics cause tissue damages, sex-specific reproductive disruption and transgenerational effects in marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Environmental Pollution*, *254*, 113024.

Wang, Q., Zhang, Y., Wangjin, X., Wang, Y., Meng, G., & Chen, Y. (2020c). The adsorption behavior of metals in aqueous solution by microplastics effected by UV radiation. *Journal of Environmental Sciences*, *87*, 272-280.

Wang, W., Ge, J., & Yu, X. (2020d). Bioavailability and toxicity of microplastics to fish species: A review. *Ecotoxicology and environmental safety*, *189*, 109913.

Wang, Z., Lin, T., & Chen, W. (2020e). Occurrence and removal of microplastics in an advanced drinking water treatment plant (ADWTP). *Science of the Total Environment*, *700*, 134520.

Waring, R. H., Harris, R. M., & Mitchell, S. C. (2018). Plastic contamination of the food chain: A threat to human health? *Maturitas*, *115*, 64-68.

Wehrmann, A., Herlyn, M., Bungenstock, F., Hertweck, G., & Millat, G. (2000). The distribution gap is closed—First record of naturally settled pacific oysters *Crassostrea gigas* in the East Frisian Wadden Sea, North Sea. *Senckenbergiana maritima*, *30*(3-6), 153.

Wessel, N., Rousseau, S., Caisey, X., Quiniou, F., & Akcha, F. (2007). Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo [a] pyrene, 17 α -ethinylestradiol and endosulfan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic toxicology*, *85*(2), 133-142.

Woodall, L. C., Sanchez-Vidal, A., Canals, M., Paterson, G. L., Coppock, R., Sleight, V., Calafat, A., Rogers, A.D., Narayanaswamy, B.E., Thompson, R. C. (2014). The deep sea is a major sink for microplastic debris. *Royal Society open science*, 1(4), 140317.

Woods, M. N., Stack, M. E., Fields, D. M., Shaw, S. D., & Matrai, P. A. (2018). Microplastic fiber uptake, ingestion, and egestion rates in the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Marine pollution bulletin*, 137, 638-645.

Wrange, A. L., Valero, J., Harketstad, L. S., Strand, Ø., Lindegarth, S., Christensen, H. T., Dolmer, P., Kristense, P.S., Mortensen, S. (2010). Massive settlements of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Scandinavia. *Biological Invasions*, 12(5), 1145-1152.

Wright, S. L., Rowe, D., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. (2013a). Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Current Biology*, 23(23), R1031-R1033.

Wright, S. L., Thompson, R. C., & Galloway, T. S. (2013b). The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. *Environmental pollution*, 178, 483-492.

Wu, F., Wang, Y., Leung, J. Y., Huang, W., Zeng, J., Tang, Y., Chen, J., Shi, A., Yu, X., Xu, X., Zhang, H., Cao, L. (2020). Accumulation of microplastics in typical commercial aquatic species: A case study at a productive aquaculture site in China. *Science of The Total Environment*, 708, 135432.

< X >

Xue, B., Zhang, L., Li, R., Wang, Y., Guo, J., Yu, K., & Wang, S. (2020). Underestimated microplastic pollution derived from fishery activities and “hidden” in deep sediment. *Environmental science & technology*, 54(4), 2210-2217.

< Y >

Yee, M. S. L., Hii, L. W., Looi, C. K., Lim, W. M., Wong, S. F., Kok, Y. Y., Tan, B.K., Wong, C.Y., Leong, C. O. (2021). Impact of microplastics and nanoplastics on human health. *Nanomaterials*, 11(2), 496.

Yong, C. Q. Y., Valiyaveetil, S., & Tang, B. L. (2020). Toxicity of microplastics and nanoplastics in mammalian systems. *International journal of environmental research and public health*, 17(5), 1509.

Yoshii, K., Ishimitsu, S., Tonogai, Y., ARAKAWA, K., MURATA, H., & MIKAMI, H. (2004). The Pesticide Manual 11th edition, British Crop Protection Council, Surrey, UK, 1997 The Pesticide Manual 11th edition, British Crop Protection Council, Surrey, UK, 1997, 846-847, 1997. *Journal of health science*, 50(1), 17-24.

Yu, P., Liu, Z., Wu, D., Chen, M., Lv, W., & Zhao, Y. (2018). Accumulation of polystyrene microplastics in juvenile *Eriocheir sinensis* and oxidative stress effects in the liver. *Aquatic toxicology*, 200, 28-36.

Yu, Q., Hu, X., Yang, B., Zhang, G., Wang, J., & Ling, W. (2020a). Distribution, abundance and risks of microplastics in the environment. *Chemosphere*, 249, 126059.

Yu, S. P., & Chan, B. K. (2020). Intergenerational microplastics impact the intertidal barnacle *Amphibalanus amphitrite* during the planktonic larval and benthic adult stages. *Environmental Pollution*, 267, 115560.

Yu, S. P. Y., Cole, M. C., & Chan, B. K. (2020b). Effects of microplastic on zooplankton survival and sublethal responses. *Oceanography and Marine Biology*, Annu. Rev. 58, 7.

Yu, Y., Chen, H., Hua, X., Dang, Y., Han, Y., Yu, Z., Chen, X., Ding, P., Li, H. (2020c). Polystyrene microplastics (PS-MPs) toxicity induced oxidative stress and intestinal injury in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science of The Total Environment*, 726, 138679.

Yurchenko, O. V., Skiteva, O. I., Voronezhskaya, E. E., & Dyachuk, V. A. (2018). Nervous system development in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia). *Frontiers in zoology*, 15(1), 10.

< Z >

Zahm, F. (2011, June). Grenelle Environnement, plan Ecophyto 2018 et indicateurs agro-environnementaux: Outils de pilotage versus instruments d'une transformation de l'action publique agro-environnementale. In *10èmes journées françaises de l'évaluation* (pp. 13-p).

Zahrán MA, Willis AJ. Plant life in the river Nile in Egypt. Riyadh Saudi Arabia: Mars publishing house; 2003. p. 531.

Zarfl, C., & Matthies, M. (2010). Are marine plastic particles transport vectors for organic pollutants to the Arctic? *Marine Pollution Bulletin*, 60(10), 1810-1814.

ZéroPesticide (2017). Le guide des solutions. Ministère de l'environnement, de l'énergie et de la mer. http://www.var.gouv.fr/IMG/pdf/10- guide_zero_pesticides.pdf (consulté en Janvier 2021).

Zhang, C., Chen, X., Wang, J., & Tan, L. (2017). Toxic effects of microplastic on marine microalgae *Skeletonema costatum*: interactions between microplastic and algae. *Environmental pollution*, 220, 1282-1288.

Zhang, F., Man, Y. B., Mo, W. Y., Man, K. Y., & Wong, M. H. (2020a). Direct and indirect effects of microplastics on bivalves, with a focus on edible species: A mini-review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(20), 2109-2143.

Zhang, M., & Xu, L. (2020b). Transport of micro-and nanoplastics in the environment: Trojan-Horse effect for organic contaminants. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1-37.

Zhao, S., Zhu, L., Wang, T., & Li, D. (2014). Suspended microplastics in the surface water of the Yangtze Estuary System, China: first observations on occurrence, distribution. *Marine pollution bulletin*, 86(1-2), 562-568.

Zhao, J., Ran, W., Teng, J., Liu, Y., Liu, H., Yin, X., Cao, R., Wang, Q. (2018). Microplastic pollution in sediments from the Bohai Sea and the Yellow Sea, China. *Science of the Total Environment*, 640, 637-645.

Zhao, L., Qu, M., Wong, G., & Wang, D. (2017). Transgenerational toxicity of nanopolystyrene particles in the range of $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science: Nano*, 4(12), 2356-2366.

Zhou, J. L. (2008). Occurrence and persistence of antifouling biocide Irgarol 1051 and its main metabolite in the coastal waters of Southern England. *Science of the total environment*, 406(1-2), 239-246.

Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., & Jiang, G. (2008). Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica chimica acta*, 606(2), 135-150.

Zitko, V., & Hanlon, M. (1991). Another source of pollution by plastics: skin cleaners with plastic scrubbers. *Marine Pollution Bulletin*, 22(1), 41-42.

ANNEXES

Annexe 1 – Contributions scientifiques

Articles scientifiques en préparation (1)

Bringer, A., Cachot, J., Dubillot, E., Prunier, G., Huet, V., Clérandeau, C., Evin, L., Thomas, H. (2021). Intergenerational effects of environmentally-aged microplastics on the *C. gigas* larval behaviour, development and growth. In preparation to publish in *Environmental Pollution*.

Articles scientifiques publiés issus du doctorat (6)

Bringer, A., Le Floch, S., Kerstan, A., Thomas, H. (2021). Coastal ecosystem inventory with characterization and identification of plastic contamination and additives from aquaculture materials. *Marine Pollution Bulletin*, 167, 112286.

Bringer, A., Thomas, H., Prunier, G., Dubillot, E., Bossut, N., Churlaud, C., Clerandeanu, C., Le Bihanic, F., Cachot, J. (2020). High density polyethylene (HDPE) microplastics impair development and swimming activity of Pacific oyster D-larvae, *Crassostrea gigas*, depending on particle size. *Environmental Pollution*, 260, 113978.

Bringer, A., Cachot, J., Prunier, G., Dubillot, E., Clérandeau, C., Thomas, H. (2020). Experimental ingestion of fluorescent microplastics by pacific oysters, *Crassostrea gigas*, and their effects on the behaviour and development at early stages. *Chemosphere*, 126793.

Bringer, A., Thomas, H., Prunier, G., Dubillot, E., Clerandeanu, C., Pageaud, M., Cachot, J. (2021). Toxicity and risk assessment of six widely used pesticides on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Science of The Total Environment*, 146343.

Bringer, A., Thomas, H., Dubillot, E., Le Floch, S., Receveur, J., Cachot, J., & Tran, D. (2021). Subchronic exposure to high-density polyethylene microplastics alone or in combination with chlortoluron significantly affected valve activity and daily growth of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*, 105880.

Bringer, A., Cachot, J., Dubillot, E., Lalot, B., & Thomas, H. (2021). Evidence of deleterious effects of microplastics from aquaculture materials on pediveliger larva settlement and oyster spat growth of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Science of The Total Environment*, 148708.

Articles scientifiques hors doctorat (1)

Cousin, X., Batel, A., **Bringer, A.,** Hess, S., Bégout, M. L., & Braunbeck, T. (2020). Microplastics and sorbed contaminants–Trophic exposure in fish sensitive early life stages. *Marine Environmental Research*, 161, 105126.

Chapitre d’ouvrage (2)

Bringer A., Dubillot E., Prunier G., Thomas H., “Possible interactions between environmental microplastics, copepods (*Tigriopus brevicornis*) and oysters (*Crassostrea gigas*) in the Pertuis

Charentais sea”, In F. Muttin and H. Thomas-Guyon (Eds.), *Marine Environmental Quality, Healthy Coastal Water*, chapter 7, p. 139-150, *ISTE*, London, submitted December 2020.

Mazeaud, A., Bénitez, F., Ridel, A., **Bringer, A.**, Plumejeaud, C., Brunello, P., Lerebours, A., Rabuteau, Y., Thomas, H. Governance and public policies of coastal water quality in the «Pertuis Charentais», In F. Muttin and H. Thomas-Guyon (Eds.), *Marine Environmental Quality, Healthy Coastal Water*, chapter 2, p. 19-36, *ISTE*, London, submitted December 2020

Communications orales (3)

Bringer, A., Thomas, H., Prunier, G., Dubillot, E., Clerandeu, C., Cachot, J., 5-7 May 2019. Ingestion of Microplastics by Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*, and effects on embryo-larval and swimming behavior. International Symposium on Green Chemistry (ISGC 2019), La Rochelle (France).

Bringer A., Thomas, H., Dubillot, E., Le Floch, S., Receveur, J., Cachot, J., Tran, D., November 2020. Exposure to polyethylene microplastics with or without herbicide significantly affect valve activity and growth of oyster, *Crassostrea gigas*. MICRO 2020, Lanzarote (Espagne). Distanciel (COVID-19).

Bringer, A., Cachot, J., Dubillot, E., Prunier, G., Huet, V., Clerandeu, C., Epinou, C., Evin, L., Thomas, H., 1-3 June 2021. Effets intergénérationnels des microplastiques aquacoles vieillis dans l'environnement sur le comportement, le développement et la croissance des larves d'huîtres creuses, *Crassostrea gigas*. ECOBIM – SETAC – Chapitre Saint-Laurent, Québec (Canada). Distanciel (COVID-19).

Communications affichées (8)

Bringer, A., Cachot, J., Dubillot, E., Clerandeu, C., Thomas, H., 1-4 May 2019. Effets des microplastiques collectés sur le littoral Français sur différents stades de vie chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. ECOBIM 2019, Sousse (Tunisie).

Bringer, A., Thomas, H., Prunier, G., Dubillot, E., Clerandeu, C., Cachot, J., 5-7 May 2019. Polyethylene microplastics effects on embryo-larval stage of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. International Symposium on Green Chemistry (ISGC 2019), La Rochelle (France).

Bringer, A., Thomas, H., Dubillot, E., Prunier, G., Lerebours, A., Clerandeu, C., Cachot, J., 21-24 May 2019. Evaluation de l'effet de pesticides des Pertuis Charentais à un stade précoce (embryo-larvaire) chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Groupe Français de Recherche sur les Pesticides (GFP 2019), Montpellier (France).

Benitez, F., Ridel, A., Mazeaud, A., Rabuteau, Y., **Bringer, A.**, Brunello, P., Plumejeaud, C., Lerebours, A., Thomas, H., 11-12 Juin 2019. Analyse juridique et de la gouvernance multi-niveau de la gestion de la qualité de l'eau des Pertuis Charentais. Journée scientifique et Technique de la mer, Office Français de la Biodiversité (OFB), Brest (France).

Bringer, A., Lacroix, C., Jezequel, R., Le Floch, S., Prunier, G., Lerebours, A., Cachot, J., Thomas, H., 24-26 Juin 2019. Caractérisation et identification de la pollution plastique dans une zone littorale des Pertuis Charentais. Polymères & Océans, Créteil (France).

Benitez, F., Ridet, A., Mazeaud, A., Rabuteau, Y., **Bringer, A.**, Brunello, P., Plumejeaud, C., Lerebours, A., Thomas, H., 29 Juin-1^{er} Juillet 2019. Un problème public faiblement controversé : La qualité des eaux littorales dans le Pertuis Charentais. Exposition : La Mer XXL, Nantes (France).

Bringer, A., Thomas, H., Prunier, G., Dubillot, E., Clerandeu, C., Barbarin, M., Cachot, J., May 2020. Environmental microplastics affected oyster (*Crassostrea gigas*) survival, reproduction and larval stages behaviour. SETAC Europe 26th Annual Meeting, Dublin (Irlande). Distanciel (COVID-19).

Bringer, A., Jamin, E., Dubillot, E., Huet, V., Cachot, J., Thomas, H., November 2020. Single and joint effects of chronic exposure to polyethylene microplastics and chlortoluron on oyster, *Crassostrea gigas*: biomarkers and metabolomics approaches. MICRO 2020, Lanzarote (Espagne). Distanciel (COVID-19).

Vulgarisations scientifiques (6)

Océans, le mystère plastique, (20/11/2018), Médiathèque Michel Crépeau (La Rochelle, France). Conférence de présentation du projet AQUAECO suite à la diffusion d'un reportage vidéo.

Journée mondiale de l'Océan, Animation réseau trophique, (05/04/2019), école maternelle Fénélon, (La Rochelle, France).

Pour l'amélioration de la qualité environnementale en zones conchylicoles en lien avec le réseau des bacs à marée déployé par la société SCIC T.E.O, dans le cadre du REDESA, Réseaux Déchets Sauvages, (21/06/2019), BioPole Léa Nature (La Rochelle, France).

Interactions sur le Festival Ecran Vert, Festival du film éco-citoyen, (Septembre 2019), Maison de l'étudiant (La Rochelle, France).

Les microplastiques : sources de pollution et sujet de recherche, conférence organisée avec l'association 4P Shore&Seas, (13/02/2020), Ours Café (Bordeaux, France).

Les plastiques & les littoraux, conférence organisée avec l'association 4P Shore&Seas et la Mairie de Lacanau (33), le 23/11/2020, Visioconférence (COVID-19). Replay disponible sur la plateforme « Youtube ».

Activités d'enseignement

Travaux dirigés et travaux pratiques (environ 130h au total) en Biologie animale, et Biologie cellulaire, Licence 1, Licence 2 et Licence 3 de La Rochelle Université (LRUniv) (2018-2019 ; 2019-2020 et 2020-2021).

Travaux dirigés (4 h) en EC Préparation au Projet de Recherche. Master 2 de La Rochelle Université (LRUniv) (2018-2019 & 2020-2021).

Mise en place de Travaux dirigés (15 h) en distanciel (COVID-19) en EC Physiologie de la conservation. Création de plaquette sur des solutions innovantes permettant de lutter contre la pollution plastique. Master 1 de La Rochelle Université (LRUniv) (2019-2020).

Jury de stage, aout 2019, Grondin, E. Etat des lieux des macrodéchets pêchés puis débarqués par la pêche professionnelle sur l'île d'Oléron et le bassin de Marennes. Master 2 Recherche, Sciences pour l'environnement parcours gestion de l'environnement et écologie littorale, La Rochelle Université (LRUniv).

Jury de stage, décembre 2020, Brocheriou, L. Optimisation de culture de *Tisochrysis lutea* destinés à l'élevage larvaire de bivalves. Licence professionnelle en alternance Aquaculture, La Rochelle Université (LRUniv).

Réfèrent-Chercheur pour les étudiants pour le Coursus Master en Ingénierie (2019-2020 et 2020-2021) à La Rochelle Université (LRUniv).

Gestion & organisation d'un projet long pour le Coursus Master en Ingénierie, portant sur la compréhension des contaminations en Baie d'Aytré (2021) à La Rochelle Université (LRUniv). Réalisation de TP sur les quantités de microplastiques retrouvées dans les eaux marines de la Baie d'Aytré, échantillonnées grâce au drone marin PAMELI de l'UMR LIENSs.

Encadrement de stages (10)

Gonzalvez, R., octobre-décembre 2018. Les effets de la contamination par des polluants anthropiques sur les larves D de *Magallana Gigas* dans les Pertuis Charentais. Licence 2, Science de la Vie, Parcours Coursus Master en Ingénierie, La Rochelle Université (LRUniv).

Bossut, N., avril-mai 2019. Etude de l'impact des microplastiques et de pesticides sur les larves de moules bleues (*Mytilus edulis*) et d'huitres creuses (*Crassostrea gigas*). Licence 3, Science de la Vie Parcours Biologie des Ecosystèmes Marins, Parcours Coursus Master en Ingénierie, La Rochelle Université (LRUniv).

Armange, M., avril-mai 2019. Comportement natatoire et capacité d'ingestion chez la moule bleue (*Mytilus edulis*) au stade larve-D à la suite d'une exposition à des microplastiques fluorescents, en conditions contrôlées de laboratoire. Master 1, Sciences pour l'environnement parcours gestion de l'environnement et écologie littorale, La Rochelle Université (LRUniv).

Prigent, L., avril-mai 2019. Étude de l'impact des microplastiques sur le comportement et le développement embryo-larvaire chez la Moule bleue (*Mytilus edulis*). Master 1, Sciences pour l'environnement parcours gestion de l'environnement et écologie littorale, La Rochelle Université (LRUniv).

Evin, L., octobre 2019-avril 2020. Etude de l'effet des microplastiques et herbicide sur le comportement valvaire de l'huitre creuse (*Crassostrea gigas*) et mise en place d'un protocole de

digestion des tissus pour évaluation de la contamination en microplastiques. Master 1, Sciences pour l'environnement parcours gestion de l'environnement et écologie littorale, Parcours Cursus Master en Ingénierie, La Rochelle Université (LRUniv).

Wagner, V., janvier-juin 2020. Bioaccumulation d'un pesticide par un organisme filtreur, l'huître creuse (*Crassostrea gigas*). Master 1, Sciences de la Mer et du Littoral, Université de Bretagne Occidentale (UBO).

Evin, L., avril-juin 2020. Interpréter et organiser des résultats scientifiques : effets transgénérationnels des microplastiques environnementaux chez l'huître creuse (*Crassostrea gigas*). Master 1, Sciences pour l'environnement parcours gestion de l'environnement et écologie littorale, Parcours Cursus Master en Ingénierie, La Rochelle Université (LRUniv).

Lalot, B., mai-août 2020. Etude de l'effet des microplastiques ostréicoles à différents stades de vie chez l'huître creuse (*Crassostrea gigas*). Licence Professionnelle, Aquaculture et Gestion Durable de son Environnement, La Rochelle Université (LRUniv).

Epinoux, C. novembre-février 2020-2021. Mise d'un protocole de digestion des tissus d'huîtres et observations des potentiels microplastiques ingérés par les huîtres durant une exposition préalable. Master 1, Sciences pour l'environnement parcours gestion de l'environnement et écologie littorale, Parcours Cursus Master en Ingénierie, La Rochelle Université (LRUniv).

Delacour, M. avril-juin 2021. Écotoxicologie : caractérisation de la contamination par ingestion des microplastiques dans deux modèles animaux (marin et murin). DUT Génie biologique, option génie de l'environnement, Université de Perpignan.

Formations doctorales (4/4)

MOOC, Formation en distanciel. Ethique de la recherche (15 h).

MOOC, Formation en distanciel. Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche (15 h).

Formation en présentiel. Statistiques, modèles TKTD (8 h). GDR Ecotoxicologie Aquatique, IRSTEA (Paris, France).

Formation en présentiel. Statistiques appliquées avec R (21 h). Centre de recherche CNRS, LIENSs (Chizé, France).

Formation en présentiel. Molécules marines bioactives (15 h). Laboratoire LIENSs (La Rochelle, France).

Autres

Membre du staff d'organisation du congrès international ISGC (International Symposium on Green Chemistry) à La Rochelle, du 13 au 17 Mai 2019. Accueil des participants, organisation des différentes sessions, chairman...

Annexe 2 – Travaux complémentaires du projet AQUAECOs (volet environnemental)

Dans cette Annexe, nous présentons les différentes démarches et résultats complémentaires à l'article 1 (cf. Chapitre III). L'article 1 présente certains éléments manquants afin d'établir un état des lieux complet sur la pollution plastique présente sur cette zone littorale des Pertuis Charentais. Pour ce faire, dans le cadre du projet AQUAECOs, le volet environnemental, nous a permis d'obtenir un certain nombre de résultats sur la présence de MP dans différents compartiments (biote, eau et sédiment marin notamment).

1. Les sites d'études, protocoles d'échantillonnages et analyses

A travers le volet environnemental, mené dans le cadre du projet AQUAECOs, la caractérisation de la qualité écologique du milieu a débuté en Mai 2019 et s'est concentrée sur l'étude de quatre sites situés proches ou sur les zones conchylicoles d'intérêt (Figure A1):

- ⇒ Le Martray situé au sud-ouest de l'Ile de Ré (site de référence) ;
- ⇒ La Pointe de l'Aiguillon sur Mer en sortie de Sèvre Niortaise et Lay ;
- ⇒ Fort Enet située en sortie de Charente ;
- ⇒ Mus du Loup situé en sortie de Seudre.

Des échantillons d'huîtres, d'eau et de sédiments ont été collectés aux mois de Septembre 2019, Janvier et Mai 2020 après 4, 8 et 12 mois d'exposition environnementale sous conditions des Pertuis Charentais. Les résultats ont donc été acquis pour quatre temps différents (T₀, T₄, T₈ et T₁₂).

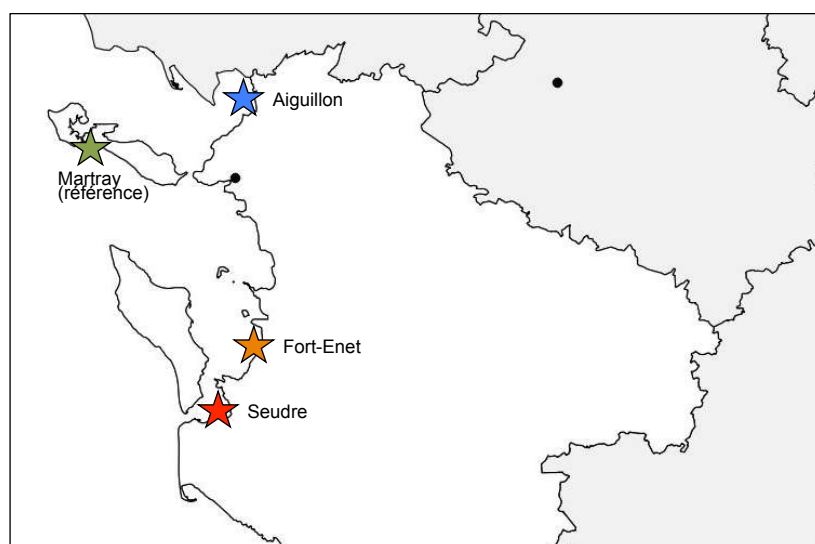


Figure A1. Carte des sites d'études de prélèvements du volet environnemental AQUAECOs. Modifié d'après les travaux de Lerebours (2021).

Échantillons d'huîtres : Des huîtres ont été prélevées (n=6) sur les quatre sites d'étude tous les quatre mois (respectivement T₀, T₄, T₈ et T₁₂). Les échantillons ont été transportés sur de la glace puis congelés à -20 °C, dans l'attente d'être digérés pour les analyses.

Analyses des échantillons : L'étape de digestion a été réalisée à l'aide d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) 10 %. En effet celui-ci possède l'avantage d'être efficace pour dégrader la matière organique sans dégrader les MP, d'être peu cher et peu dangereux (Dehaut *et al.*, 2016 ; Kazour, 2019). Dans des erlenmeyers, une huitre était placée avec un volume de 250 mL de KOH 10 %. Les erlenmeyers ont ensuite été placés sous hotte, sur un agitateur magnétique chauffant (24 h ; 60 °C). Après digestion, le digestat de chaque erlenmeyer a été filtré sur filtre GF/A (porosité de 1,6 µm) à l'aide d'un appareil Büchner. Le filtre a ensuite été placé en boîte de Pétri en verre et conservé à 4 °C, protégées par du parafilm.

Echantillons d'eau : Des prélèvements de 1 m³ d'eau ont été réalisés, à l'aide d'une motopompe et un filet à plancton (40 µm). Après filtration, 1 L d'eau restant des 1 m³ prélevés ainsi que l'eau de rinçage du filet, ont été récupéré séparément pour les analyses. Les échantillons d'eau ont ensuite été congelés à -20 °C, dans l'attente des analyses.

Analyses des échantillons : L'extraction a été réalisée par séparation par densité. Dans une ampoule à décanter, chaque échantillon de 500 mL d'eau de mer a été mélangé à 50 mL de d'une solution de chlorure de zinc (ZnCl₂) de densité 1,8, puis laissé au repos pendant 24 h. Les MP, moins denses que le mélange, remontent à la surface. Le surnageant a été récupéré et filtré de la même manière que pour les échantillons d'huîtres.

Échantillons de sédiments : Des prélèvements d'environ 500 g de la couche superficielle de sédiments (5 cm de profondeur) ont été prélevés au niveau de chaque site autour des tables ostréicoles tous les quatre mois. Les échantillons ont ensuite été congelés à -20 °C, dans l'attente des analyses.

Analyses des échantillons : Chaque échantillon a été séché à l'étuve (48 h ; 60 °C), pour obtenir une matière sèche quantifiable. Une première étape de digestion de la matière organique a été réalisée avec de l'eau oxygénée (H₂O₂), où 10 g de sédiment ont été mélangé à 40 mL de H₂O₂. Chaque échantillon a ensuite été placé sous hotte sur un agitateur magnétique chauffant (24 h ; 40 °C). Une séparation par densité a ensuite été réalisée, ainsi qu'une filtration, sous le même protocole que pour les échantillons d'eau.

L'un des enjeux principaux au cours de toutes les étapes expérimentales était d'éviter la contamination extérieure. Effectivement, les potentielles fibres textiles peuvent venir se coller rapidement aux échantillons préparés. Les analyses ont été réalisées sous une sorbonne. Tous les équipements ont été nettoyés à l'éthanol 70 % avant et après usages, la verrerie toujours rincée trois fois à l'eau Milli-Q avant chaque usage. Les solutions utilisées étaient filtrées trois fois au préalable (0,2 µm). Pour chaque étape, un contrôle négatif a été réalisé et analysé pour vérifier l'absence de contamination.

L'observation a été réalisée sur une loupe binoculaire Olympus SZX12 (grossissement x10 à x20), à l'aide d'une caméra Leica MC190 HD. L'application ImageJ 1.53 a été utilisée pour analyser les photos de microplastiques. Les filtres ont été étudiés de manière à éviter un double comptage : suivant une lecture verticale de bas en haut sur la première colonne, puis de bas en haut sur la seconde, et ainsi de suite (Kazour, 2019). Plusieurs critères ont été vérifiés pour chaque particule pour les identifier en tant que MP : absence de répétition de structure indiquant une origine biologique, couleur homogène, si forme fibreuse, épaisseur constante (Enders *et al.*, 2015).

L'observation seule de MP à la loupe binoculaire ne suffit pas pour leur identification et peut conduire à une surestimation de leur nombre. Une validation du nombre de MP observés et une identification des polymères les constituants sont donc des étapes indispensables (Kazour, 2019). La spectrométrie

Raman permet d'analyser des particules d'une taille pouvant descendre jusqu'à 1 μm (Phuong *et al.*, 2018c). Les bivalves accumulant de préférence les petits MP (<100 μm) (Browne *et al.*, 2008 ; Kazour & Amara, 2020 ; Phuong, 2018 ; Qu *et al.*, 2018), il était important de choisir une méthode fiable pour les identifier.

Les analyses Raman, de la démarche environnementale, sont en cours de finalisation au moment de la rédaction de ce manuscrit de thèse.

2. Résultats quantitatifs et qualitatifs

2.1 Dans le biote (huîtres, *C. gigas*)

On observe que les huîtres ont vu leur quantité de MP augmenter après 12 mois d'exposition en conditions environnementales, en particulier sur le site de la Seudre (51,5 \pm 8,4 MP.ind⁻¹) et dans une moindre mesure sur les sites de l'Aiguillon (24,3 \pm 6,0 MP.ind⁻¹) et de Fort Enet (24,0 \pm 3,6 MP.ind⁻¹). En revanche, la concentration n'a pas augmenté au niveau du site du Martray (10,0 \pm 1,2 MP.ind⁻¹), site de référence. En prenant en compte les quantités de MP.g⁻¹ d'huîtres, le site de la Seudre semble plus impacté que les autres avec des concentrations en MP plus importantes. Les sites de Fort Enet et Aiguillon semblent moins influencés par la présence de MP (Tableau A1).

Tableau A1. Quantification des microplastiques dans les huîtres sur les différents sites d'étude aux quatre temps de prélèvements (Lerebours, 2021).

Prélèvements / Sites	T ₀		T ₄		T ₈		T ₁₂	
	MPs (nb)	MPs/g	MPs (nb)	MPs/g	MPs (nb)	MPs/g	MPs (nb)	MPs/g
Martray (référence)	9,6 \pm 2,1	4,1 \pm 1,1	7,8 \pm 2,7	0,8 \pm 0,1	8,2 \pm 1,3	1,1 \pm 0,2	10,0 \pm 1,2	0,8 \pm 0,1
Aiguillon	9,6 \pm 2,1	4,1 \pm 1,1	12,5 \pm 2,0	1,0 \pm 0,3	10,8 \pm 2,6	1,3 \pm 0,3	24,3 \pm 6,0	1,7 \pm 0,4
Fort-Enet	9,6 \pm 2,1	4,1 \pm 1,1	11,8 \pm 1,6	1,2 \pm 0,3	16,5 \pm 3,5	1,3 \pm 0,2	24,0 \pm 3,6	1,9 \pm 0,3
Seudre	9,6 \pm 2,1	4,1 \pm 1,1	15,5 \pm 3,4	1,6 \pm 0,3	13,3 \pm 2,9	2,3 \pm 0,4	51,5 \pm 8,4	5,2 \pm 1,1

Au vu des résultats, du volet environnemental du projet AQUAECO, les fibres sont majoritairement présentes dans les huîtres. Des fibres de couleurs bleues ou noires pour la majeure partie constituées de Polyamide (PA) ou de polyéthylène terephthalate (PET) sont retrouvées. Des fragments bleus ou rouges constitués de polystyrène (PS) ou polycarbonate (PA) sont aussi retrouvés.

Sur les 12 mois d'exposition, tous temps et tous sites confondus, les MP totaux retrouvés par individu, dans les huîtres sont de 13,4 \pm 1,1 MP.ind⁻¹. Les tailles des MP variaient de 6 à 4500 μm dans les huîtres et étaient en moyenne de 114 μm .

2.2 Dans l'eau de mer

Le nombre de MP moyen retrouvé dans les échantillons d'eau variait entre 0,03 et 0,06 MP.L⁻¹ selon les sites et les temps. Les MP présents dans l'eau de mer étaient principalement des fibres (52 %) puis des fragments (41 %) et des billes (7 %).

En comparaison avec les échantillons d'huîtres, l'eau de mer contient une part plus importante de fibres. La taille des MP dans l'eau de mer variait entre 4 et 2000 μm et étaient en moyenne de 144 μm .

2.3 Dans les sédiments

La concentration en MP était en moyenne dans les sédiments de $0,8 \pm 0,3 \text{ MP.g}^{-1}$ de sédiment sec, variant de $0,3 \text{ MP.g}^{-1}$ au Martray à $1,5 \text{ MP.g}^{-1}$ à Fort Enet. En terme de proportions de MP retrouvés, 54 % des MP observés étaient des fibres, 43 % des fragments et 3 % des billes. La taille des MP dans les sédiments variait entre 8 et 2000 μm avec une moyenne de 234 μm .

2.4 Bilan

La contamination en microplastiques des Pertuis Charentais a été évaluée pour la première fois dans différentes matrices : huîtres, eau de mer et sédiments. Pendant une année, des prélèvements tous les quatre mois ont été effectués sur quatre sites principaux : le site de référence du Martray (exposé aux eaux océaniques), les sites de la pointe de l'Aiguillon (en embouchure de Sèvre Niortaise), de Fort Enet (en embouchure de Charente) et celui en embouchure de Seudre. Tous les échantillons contenaient des MP. Les huîtres ont vu leur quantité de MP augmenter au cours du temps et de leur croissance. En particulier, le site Seudre se distingue avec une contamination plus importante que les trois autres sites. Ces résultats ont permis d'identifier des zones d'études plus contaminées en MP. L'identification de la nature de ces MP est nécessaire pour émettre des hypothèses sur leur origine. Une investigation sur les émetteurs principaux de la région sera intéressante (*e.g.* industries présentes, analyse des rejets en sortie de station d'épuration, matériaux utilisés par les conchyliculteurs, peintures employées pour les bateaux).

Annexe 3 – « Supplementary data » des différents articles scientifiques

- **Article 2:** Effets des microplastiques commerciaux de différentes tailles de polyéthylène (HDPE) sur le développement et l'activité natatoire au stade embryo-larvaire de l'huître creuse (*C. gigas*).

Table S1. Frequency of abnormal D-larvae (%) and developmental arrest (%) in D-larvae of *C. gigas* exposed to Cu or HDPE MPs. Control (without pollutants): 0.1, 1 and 10 correspond to concentrations of copper ($\mu\text{g Cu.L}^{-1}$) or PE MP (mg MP.L^{-1}) using for exposures. Means values \pm SEM. Different letters indicated significant differences between different concentrations ($p < 0.05$).

Conditions	Abnormal larvae	Developmental arrest
Control	12.8 \pm 1.3 ^a	4.6 \pm 0.5 ^a
Cu 0,1	42.5 \pm 6.4 ^b	12.9 \pm 2.5 ^b
Cu 1	43.2 \pm 7.2 ^b	15.9 \pm 3.2 ^b
Cu 10	30.2 \pm 3.3 ^b	37.8 \pm 9.7 ^c
MP (4-6 μm) 0,1	38.1 \pm 7.1 ^b	7.6 \pm 1.1 ^{ab}
MP (4-6 μm) 1	37.7 \pm 5.0 ^b	10.2 \pm 1.1 ^b
MP (4-6 μm) 10	50.1 \pm 4.8 ^b	12.1 \pm 1.9 ^b
MP (11-13 μm) 0,1	19.7 \pm 3.0 ^{ab}	9.9 \pm 1.0 ^b
MP (11-13 μm) 1	25.4 \pm 2.4 ^b	13.1 \pm 2.5 ^b
MP (11-13 μm) 10	30.5 \pm 3.8 ^b	17.7 \pm 0.7 ^c
MP (20-25 μm) 0,1	11.8 \pm 1.0 ^{ab}	9.0 \pm 1.3 ^a
MP (20-25 μm) 1	10.6 \pm 1.5 ^a	7.1 \pm 1.5 ^a
MP (20-25 μm) 10	16.3 \pm 1.5 ^b	10.7 \pm 0.7 ^a

Table S2. Maximum and average speeds ($\mu\text{m.s}^{-1}$) recorded for D-larvae of *C. gigas* exposed for 24h to different concentrations of Cu or HDPE MPs. Control (without pollutants): 0.1, 1 and 10 correspond to concentrations of copper ($\mu\text{g Cu.L}^{-1}$) or PE MP (mg MP.L^{-1}) used for exposures. Means values \pm SEM. Different letters indicated significant differences between different concentrations ($p < 0.05$).

Conditions	Maximum speed	Average speed
Control	192 \pm 7 ^a	109 \pm 3 ^a
Cu 0,1	175 \pm 4 ^a	120 \pm 3 ^b
Cu 1	150 \pm 6 ^b	97 \pm 4 ^c

MP (4-6 μm) 0,1	151 ± 5^b	88 ± 4^b
MP (4-6 μm) 1	119 ± 6^c	66 ± 4^c
MP (11-13 μm) 0,1	192 ± 8^b	125 ± 5^b
MP (11-13 μm) 1	155 ± 6^c	100 ± 4^c
MP (20-25 μm) 0,1	128 ± 19^a	61 ± 8^b
MP (20-25 μm) 1	96 ± 17^a	49 ± 9^c

- **Article 3:** Ingestion et effets sur le développement et le comportement natatoire sur les larves d'huître creuse (*C. gigas*) de microplastiques commerciaux fluorescents.

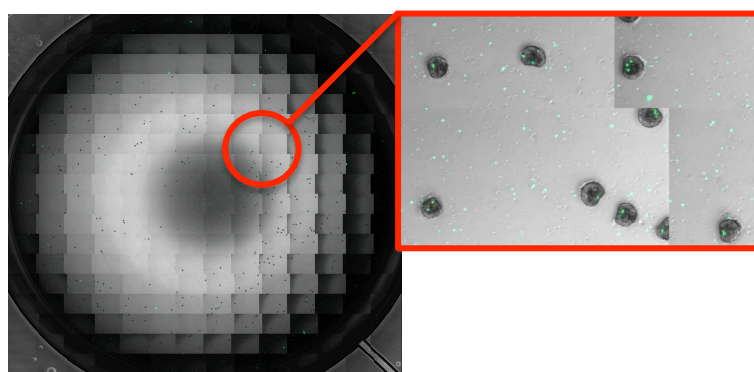


Figure S1. Counting method (superimposing pictures to reconstruct wells) to determine MP presence/absence in D-larvae using a zooming function.

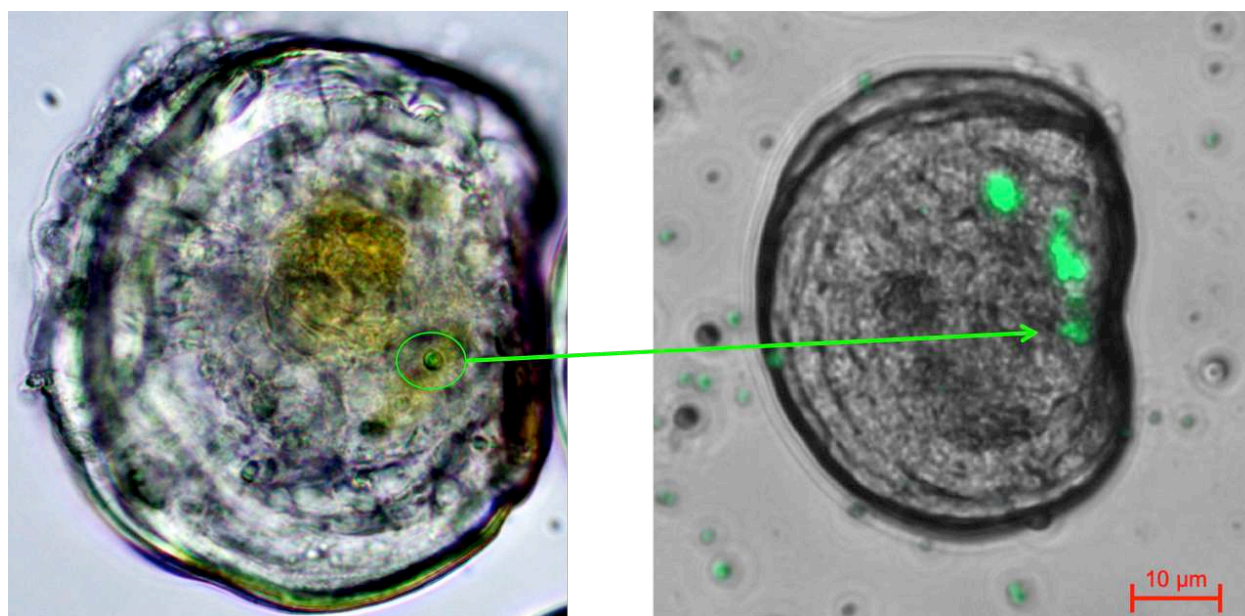


Figure. S2. Microscopic pictures (ZEISS Axio Observer Z1) of oyster-D larvae exposed to fluorescent MPs (1-5 μm). On the left picture: fluorescent microbead in the larva digestive tract (described by Jones and Jones, 1988). On the right picture: larva with agglomerates MP microbeads with exposure of 1 mg MP. L^{-1} .

Table S3. Body length (μm), abnormal D-larvae (%), developmental arrest (%) and maximum swimming speed ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) for oyster larvae that were exposed to MPs for a 24-hour period at the embryonic stage (0; 0.1; 1 and 10 mg MP. L^{-1}). Values are expressed as mean \pm SEM. A variation in letters indicates significant differences between concentrations ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test and ANOVA).

Conditions	Body length	Abnormal	Developmental arrest	Maximum speed
Control	73.6 \pm 6.7 ^a	14.8 \pm 1.2 ^a	4.1 \pm 0.4 ^a	167.4 \pm 5.1 ^a
0.1 mg MP.L ⁻¹	60.3 \pm 0.7 ^b	17.5 \pm 0.9 ^a	6.8 \pm 0.6 ^{ab}	148.5 \pm 3.7 ^b
1 mg MP.L ⁻¹	58.3 \pm 3.7 ^{bc}	35.2 \pm 2.2 ^b	8.5 \pm 0.7 ^b	135.6 \pm 3.0 ^c
10 mg MP.L ⁻¹	55.9 \pm 6.3 ^c	37.3 \pm 2.0 ^b	15.3 \pm 1.6 ^b	137.9 \pm 3.1 ^c

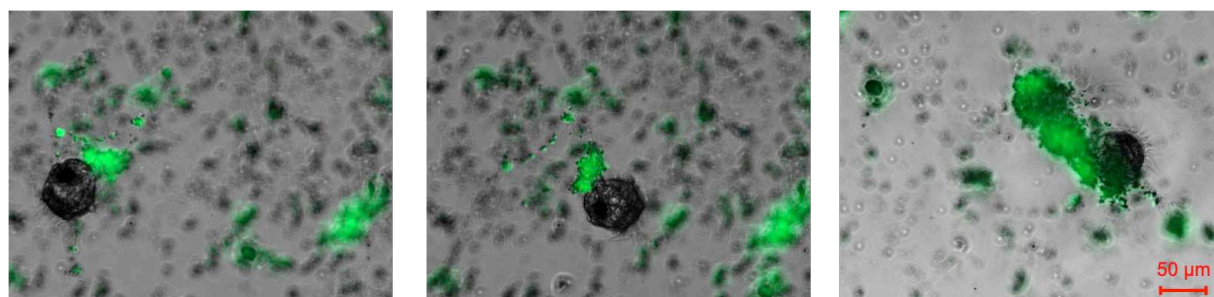


Figure S4. Screenshots taken from the recorded videos (ZEISS Axio Observer Z1) of oyster D-larvae exposed to fluorescent MPs for 24 hours (1 mg MP. L^{-1}) at the embryonic stage. Presence of fluorescent MP as agglomerates close to the eyelashes and the larval mantle.

- **Article 4:** Évaluation de la toxicité et des risques de six pesticides commerciaux, sur le développement, la croissance et le comportement larvaire de l'huître creuse (*C. gigas*).

Table S1. Physic-chemical characteristics and regulatory values of pesticides tested in this study (Ineris, 2020).

Substance	N°CAS	Log Kow	Koc ($\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$)	PNEC ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	MAC _{marine} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	NQE _{marine} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Glyphosate	1071-83-6	-3.2	884-60,000	/	14	/
Isoproturon	34123-59-6	2.5	139	0.32	1	0.3
Nicosulfuron	111991-9-4	0.61	34-135.6	$3.5\cdot 10^{-5}$	17	$3.5\cdot 10^{-3}$
Chlorotoluron	15545-48-9	2.5	108-384	0.01	0.2	0.1
Boscalid	188425-85-6	2.96	507-1,110	12.5	10	/

N°CAS: Chemical Abstracts Service number.

Kow: Octanol/Water ratio coefficient

Koc: Organic Carbon/Water ratio coefficient

PNEC: Predicted No Effect Concentration

MAC_{marine}: Maximum Acceptable Concentration in seawater.

NQE_{marine}: Environmental Quality Standard in seawater.



Figure S1. Map of Pertuis Charentais (South West, France) with Charente and Seudre Rivers. The colored stars represent the detection zones of the maximum concentrations for the pesticides tested in the framework of this present study (Qalyse & CD17, 2020).

Table S2. EC₅₀ (in $\mu\text{g.L}^{-1}$) determined for each pesticides and each endpoints analysis. The values in bold correspond to the relevant EC₅₀.

Endpoints Pesticides	Developmental arrest	Development anomalies	Growth	Swimming speed
	Roundup	0.62	NA	12.2
Glyphosate	241	NA	NA	NA
Isoproturon	1.4	NA	7.1	NA
Nicosulfuron	0.3	0.74	NA	247
Chlortoluron	1.6	2.36	0.11	NA
Boscalid	0.16	0.05	0.04	NA

NA: no available

- **Article 6:** Effets de contaminants chimiques commerciaux (microplastiques de polyéthylène (HDPE) et/ou d'un herbicide) sur le comportement valvaire des naissains d'huître creuse (*C. gigas*).

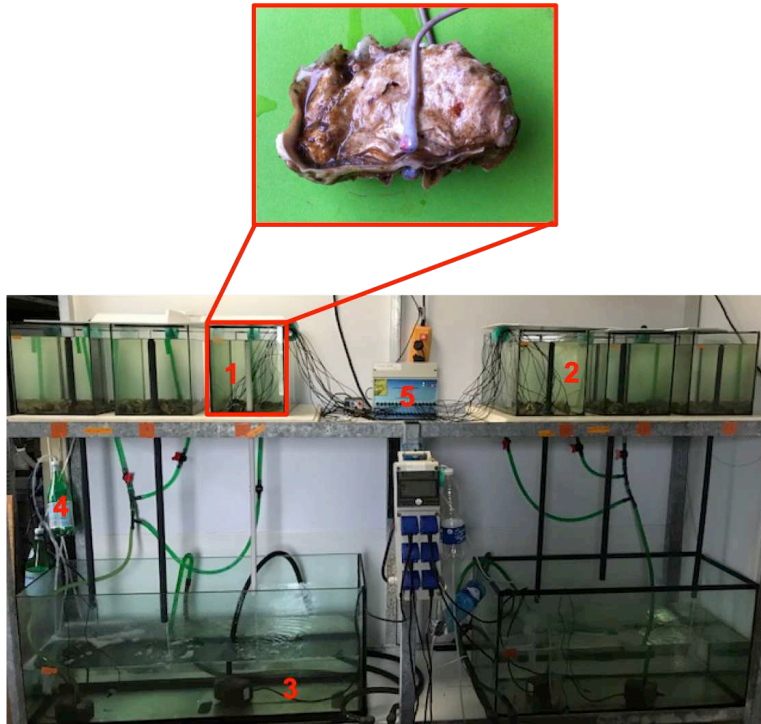


Fig. S1. Experimental design located in an experimental laboratory (LIENSs La Rochelle – CNRS). The numbers correspond to: (1) experimental batch of exposed oysters equipped with valvometric electrodes (zoom picture), (2) second experimental batch of exposed oysters, (3) buffer tank, (4) reduced vibrations thanks to the capacitance chamber and (5) HFNI valvometer (High Frequency Non-Invasive) connected to the electrodes stuck on oysters.

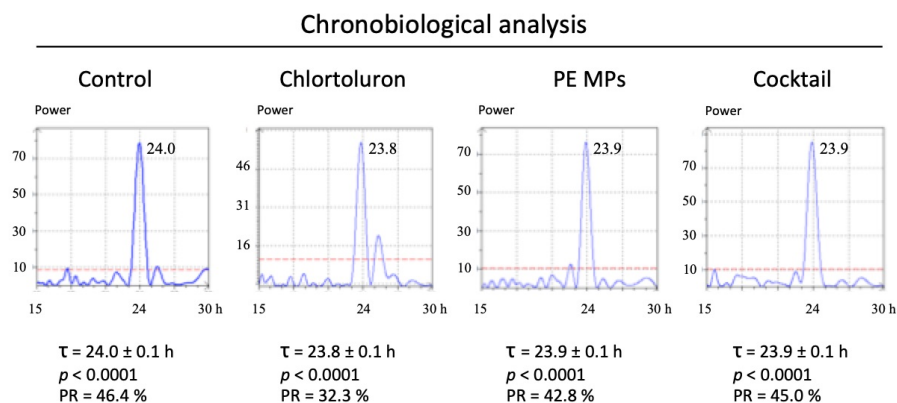


Fig. S2. Rhythmic valve behaviour of *C. gigas*. For each condition, the daily periodicity (τ) was determined by spectral analysis (Lomb and Scargle periodogram). The X axis indicates the test duration in order to determine a significant period. The Y axis displays the power (arbitrary units) of the determined period. The red dotted line highlights a significant period for p -value = 0.95.

- **Article 7:** Effets intergénérationnels des microplastiques aquacoles vieillis dans l'environnement, à divers stades de vie (survie/fécondation au stade adulte et génération larvaire) chez l'huître creuse (*C. gigas*).

Table S1. Reproduction of adult oysters (n=10) exposed for two months to various concentrations of environmental MPs: 0 (control condition, without MPs), 0.1 and 10 mg MP. L⁻¹.

Conditions (mg MP.L ⁻¹)	Gamete emission	Sex	Couples	Gamete quality
0	6/10	Male 1	Couple 1 (C1) : Male 1 + Female 1 Couple 2 (C2) : Male 1 + Female 2 Couple 3 (C3) : Male 2 + Female 3	YES
		Male 2		YES
		Female 1		YES
		Female 2		YES
		Female 3		YES
		Female 4		YES
0.1	7/10	Male 1	C1 : Male 1 + Female 1 C2 : Male 4 + Female 1 C3 : Male 4 + Female 2	YES
		Male 2		NO
		Male 3		NO
		Male 4		YES
		Male 5		NO
		Female 1		YES
10	8/10	Male 1	C1 : Male 3 + Female 1 C2 : Male 5 + Female 3 C3 : Male 5 + Female 1	NO
		Male 2		NO
		Male 3		YES
		Male 4		NO
		Male 5		YES
		Female 1		YES
Female 2	NO			
Female 3	YES			

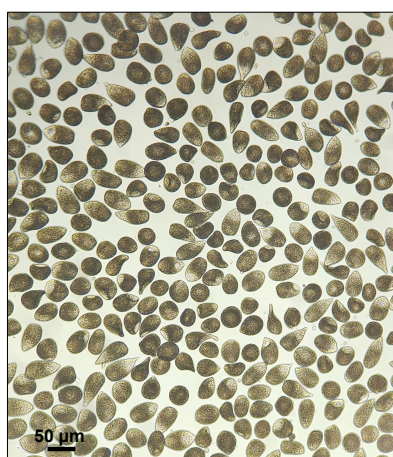


Figure S2. Microphotography of oocytes after ejection of female gametes. Scale bar = 50 μm.

Annexe 4 – Figures complémentaires

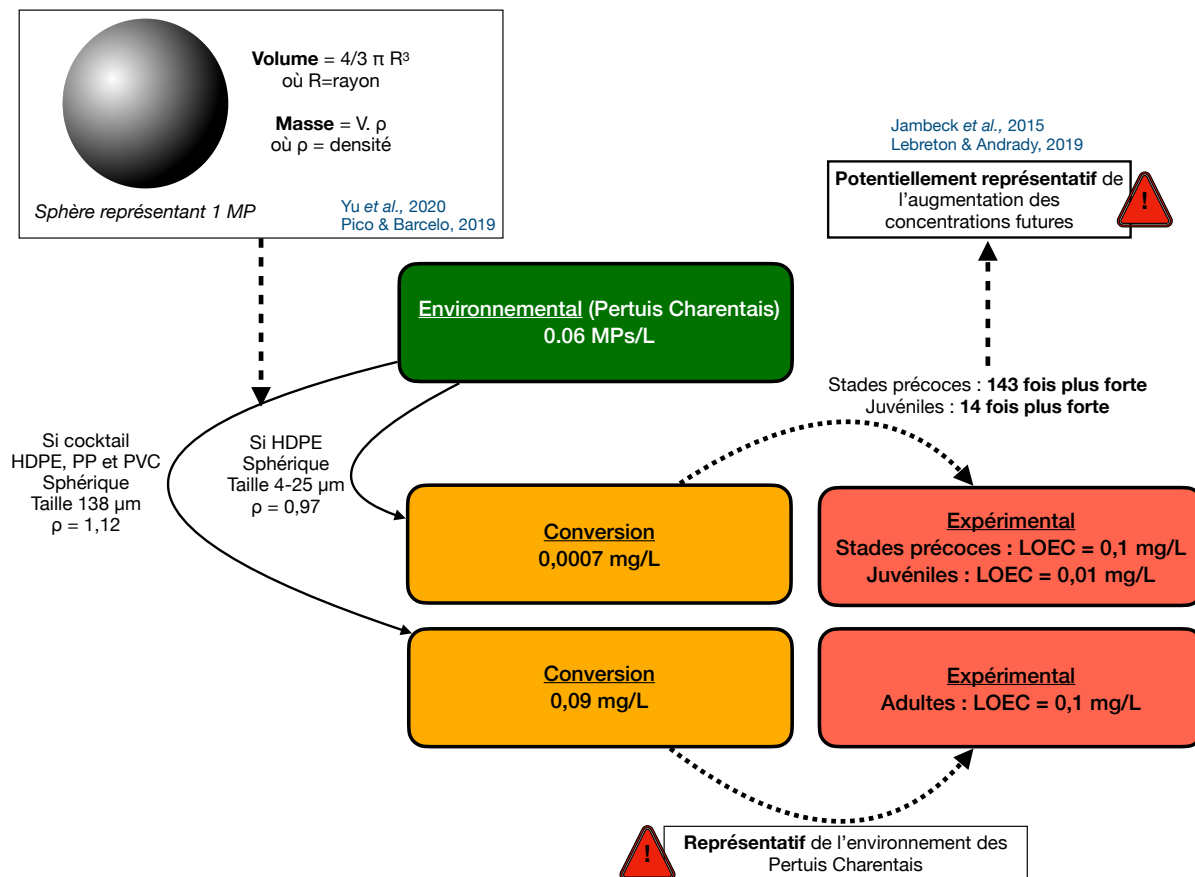


Figure A2. Représentation des méthodes de conversion massique (MP/L en mg/L) afin de comparer les concentrations retrouvées dans l'environnement des Pertuis Charentais et les concentrations testées dans le cadre des travaux de thèse. LOEC correspond à la plus faible concentration ayant montré un effet en conditions expérimentales. D'après les travaux de Jambeck *et al.* (2015) ; Pico & Barcelo (2019) ; Lebreton & Andrady (2019) et Yu *et al.* (2020a).



Environnement & Conchyliculture : étude des effets des microplastiques et pesticides chez l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, des Pertuis Charentais.

Mots-clés: Huître creuse ; *Crassostrea gigas* ; Microplastiques ; Pesticides ; Écotoxicologie ; Stades précoces.

Résumé : Les microplastiques (MP) sont largement répandus dans les zones côtières et les océans du monde entier. Les MP sont préoccupants sur le plan environnemental en raison de leurs impacts potentiels sur un large éventail d'organismes marins, de sorte que l'évaluation de leur impact sur les écosystèmes est devenue une priorité de recherche. En complément, les substances phytosanitaires utilisées régulièrement en agriculture se déversent dans les milieux côtiers, par ruissellements. Ces travaux de thèse se sont focalisés sur (i) une étude exploratoire d'un site pilote des Pertuis Charentais (PC) afin d'évaluer l'importance de la contamination plastique et pouvoir évaluer leur toxicité sur (ii) les stades précoces et (iii) tardifs de développement de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*. Ces travaux fournissent une première investigation de l'état de contamination plastique (macro et micro) d'un site d'étude littoral des PC, où la présence de plastiques ostréicoles ainsi que des concentrations élevées en MP dans les sédiments de plage ont été identifiés. De plus, les expérimentations menées en conditions de laboratoire contrôlées, nous informent sur le caractère toxique des MP de PE et des pesticides sur les stades précoces de développement (embryo-larvaire) de l'huître creuse. Les pesticides dosés dans les eaux des PC ont montré des effets significatifs à des concentrations proches de l'environnement naturel alors que les MP s'avèrent toxiques pour des concentrations plus fortes. Ces effets apparaissent sur le développement, la croissance et le comportement natatoire des larves d'huître creuse. Des expérimentations complémentaires, effectuées sur des stades plus tardifs, notamment les naissains d'huître creuse, ont permis de montrer un comportement valvaire modifié suite à une exposition de 25 jours aux MP de type PE et au Chlortoluron, en conditions de laboratoire. Les effets intergénérationnels ont pu être observés avec l'utilisation de MP environnementaux (cocktail de PE, PP et PVC), vieillies aux abords des concessions ostréicoles. La qualité et le succès de fécondation ont été modifiés ainsi que le développement et le comportement de nage des larves-D issues de parents préalablement exposés durant deux mois. Ces premiers résultats permettront de renforcer les connaissances de la communauté scientifique et d'informer les professionnels et acteurs conchylicoles sur les risques des contaminants émergents, tels que les MP et les pesticides. Des adaptations des pratiques conchylicoles seront nécessaires afin d'éviter une probable dégradation de la qualité des eaux littorales dans les PC.

Environment & Aquaculture: effects study of microplastics and pesticides on Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Pertuis Charentais area.

Keywords: Oyster ; *Crassostrea gigas* ; Microplastics ; Pesticides ; Ecotoxicology ; Early-life development.

Abstract: Microplastics (MPs) are widely distributed in coastal areas and oceans around the world. MPs are of environmental concern due to their potential impacts on a wide range of marine organisms, so assessing their impact on ecosystems has become an urgent research priority. In addition, the phytosanitary substances regularly used in agriculture flow into coastal environments by runoff. This thesis focused on (i) an exploratory study of a pilot site in Pertuis Charentais (PC) in order to assess the extent of plastic contamination in order to be able to perform toxicity tests on (ii) the early and (iii) late stages of development in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. This work provides a first investigation of the plastic contamination state (macro and micro) of a coastline PC pilot study site, where the presence of aquaculture plastics as well as significant concentrations of MPs in beach sediments, have been identified. In addition, the experiments carried out under controlled laboratory conditions, inform us about the toxic effects of PE-MPs and pesticides on the early stages of development (embryotoxicity). Pesticides dosed in PC seawater have shown significant effects at concentrations close to the natural environment, while MPs are toxic at higher concentrations. Effects on development, growth, and swimming behaviour are to be noted. Additional experiments were carried out on later stages in particular oyster spat showed altered valve behaviour following a 25-day exposure to PE-MPs and chlortoluron, under laboratory conditions. Intergenerational effects have been observed with the use of environmental MPs (cocktail of PE, PP and PVC), aged near oyster farms. The quality and success of fertilization was modified as well as the development and behaviour of D-larvae from parents exposed for two months. These initial results will help strengthen the knowledge of the scientific community and inform shellfish industry professionals and stakeholders on the risks of emerging contaminants, such as MPs and pesticides. Adaptations of shellfish farming practices will be necessary in order to avoid a probable deterioration in the quality of coastal waters in the PC.

