



**HAL**  
open science

# **Perturbations comportementales, physiologiques et cellulaires chez des mollusques bivalves exposés à un pétrole brut dans un contexte mono ou multistress.**

Alison Miserazzi

► **To cite this version:**

Alison Miserazzi. Perturbations comportementales, physiologiques et cellulaires chez des mollusques bivalves exposés à un pétrole brut dans un contexte mono ou multistress.. Ecotoxicologie. Université de Bordeaux, 2020. Français. NNT : 2020BORD0055 . tel-03698736

**HAL Id: tel-03698736**

**<https://theses.hal.science/tel-03698736>**

Submitted on 19 Jun 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.

THESE PRESENTEE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE  
L'UNIVERSITE DE BORDEAUX**

ECOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENIRONNEMENTS  
SPECIALITE GEOCHIMIE ET ECOTOXICOLOGIE

Par ALISON MISERAZZI

**Perturbations comportementales, physiologiques et cellulaires  
chez des mollusques bivalves exposés à un pétrole brut  
dans un contexte mono ou multistress**

Sous la direction de : Jean-Charles MASSABUAU

Soutenue le 18 juin 2020

Membres du jury :

Benoit Sautour	Professeur, Université de Bordeaux	Président
Laure Giamberini	Professeure, Université de Lorraine	Rapportrice
Hélène Hegaret	CR1 CNRS, Université de Bretagne Occidentale	Rapportrice
Frédéric Angelier	CR1 CNRS, Centre d'Etude Biologique de Chizé	Examineur
Jérôme Cachot	Professeur, Université de Bordeaux	Examineur
Philippe Blanc	PhD, TOTAL SA, Responsable R&D Aquatic Environmental Monitoring	Invité
Stéphane Le Floch	PhD, Chef du Service Recherche CEDRE, Brest	Invité
Jean-Charles Massabuau	DR Emérite, CNRS, Université de Bordeaux	Directeur de thèse



**Perturbations comportementales, physiologiques et cellulaires  
chez des mollusques bivalves exposés à un pétrole brut  
dans un contexte mono ou multistress**

Alison Miserazzi

2020



# RESUME

L'utilisation d'outils adaptés, efficaces et fiables est fondamentale pour mesurer et contrôler l'impact environnemental autour des installations industrielles. Robuste, autonome et permettant un suivi à distance et en ligne, la Valvométrie HFNI (Haute Fréquence Non Invasive) est une solution possible pour le biomonitoring des écosystèmes aquatiques. Elle permet l'étude à distance et en temps quasi réel du comportement et de différents traits de vie de groupes de mollusques bivalves dans le milieu naturel par numérisation de leur activité valvaire. Les animaux sont ainsi utilisés comme des témoins représentatifs de la qualité de l'eau, capables de traduire la survenue d'évènements modifiant leur environnement. Détecter rapidement le début d'une perturbation et identifier sa nature sont des éléments clés du processus de réduction du risque environnemental. À ce titre, le premier objectif de cette thèse était d'analyser, en situation multistress, les réponses comportementales de mollusques bivalves exposés à un pétrole brut dans un contexte environnemental réaliste. Le second objectif était d'évaluer les perturbations sous-jacentes de leur milieu intérieur lors de l'exposition au pétrole brut et mieux comprendre le mécanisme des changements de comportement. Pour ce faire, des études ont été réalisées chez deux espèces de mollusques bivalves, la palourde d'eau douce *Corbicula fluminea* et l'huître marine *Magallana gigas*, en conditions semi-naturelles ou contrôlées de laboratoire, avec des concentrations de pétrole brut constantes ou variables, environnementales (et dans un cas létales), et en présence de différents facteurs de stress additionnels : la température de l'eau, la turbidité, la présence de baryum, de pollution sonore ou d'hypoxie. La réponse comportementale au pétrole brut s'est avérée (i) claire et discernable dans la majorité des situations créées et (ii) fonction de la concentration, ce qui permet de proposer un schéma global d'évolution d'indices valvométriques dans la gamme 0 – 60 mg·L<sup>-1</sup>. Les perturbations du milieu intérieur ont été évaluées par une approche de protéomique sur des tissus en relation avec l'activité comportementale (branchies, muscles, ganglions nerveux). Quel que soit le tissu étudié, l'espèce ou les conditions d'exposition, les résultats traduisent une modification des processus métaboliques et cellulaires avec un impact toxicologique fonction de la contamination quantifiée par des dosages de HAP dans les tissus ou des valeurs nominales d'exposition. Ces analyses permettent d'aborder les bases explicatives du comportement chez les bivalves, de corrélérer comportement et changements du milieu intérieur et ouvrent la voie à des perspectives d'évaluation d'impacts en ligne et à distance.

**Mots-clés :** Biosurveillance, Valvométrie HFNI, Pétrole brut, Multistress, Protéome, HAP



# ABSTRACT

The use of adapted, efficient and reliable tools is fundamental to measure and control the environmental impact surrounding industrial installations. Robust, autonomous and working by remote control, HFNI (High Frequency Non Invasive) Valvometry is one possible solution for the biomonitoring of aquatic ecosystems. Based on valve activity scanning, it enables the study of behavior and different life traits of bivalve mollusks in the natural environment. Animals are used as biosensors representative of water quality and capable of reflecting the occurrence of environmental alteration. Detecting a disturbance and identifying its nature are key elements in the process of reducing environmental risk. As such, the first objective of this work was to analyze the behavioral response to crude oil of bivalve mollusks instrumented with HFNI Valvometry in a multistress context. The second objective was to evaluate the underlying disturbances occurring in their *milieu intérieur* when exposed to crude oil with the ultimate goal of associating behavioral changes (symptoms) and physiological disorders. To do so, studies were conducted on two species, the freshwater clam *Corbicula fluminea* and the marine oyster *Magallana gigas*, under controlled laboratory or semi-natural conditions. We used crude oil at environmentally realistic concentrations, either constant or variable and in one case lethal. We used various stress factors: water temperature, turbidity, presence of barium, noise pollution and hypoxia. The behavioral response to crude oil was found to be (i) clear and distinguishable in the majority of situations and (ii) concentration-dependent, allowing to propose a global relationship between a valvometric index and crude oil concentration in the range 0 - 60 mg·L<sup>-1</sup>. Disturbances in the *milieu intérieur* were assessed using a proteomic approach on tissues directly involved in behavioral activity (gills, muscles, nervous ganglia). Whatever the tissue studied, the species or the exposure conditions, the results reflect a disruption of metabolic and cellular processes with a dose-effect toxicological impact quantified by PAH analyses in tissues or nominal exposure values. As a whole, this new set of analyses (i), confirms the capacities of the valvometry concept in the oil and gas field, (ii) make it possible to approach the relationship between behavior and underlying physiological changes bivalves and (iii) pave the way to new perspectives for online and remote impact assessment.

**Keywords:** Biomonitoring, HFNI Valvometry, Crude Oil, Multistress, Proteome, PAH





# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury. Je remercie particulièrement les rapporteurs et examinateurs de ces travaux de thèse.

Un très grand merci à mon directeur de thèse Jean Charles Massabuau. Merci pour votre encadrement, votre pédagogie, votre disponibilité et votre soutien. Merci pour la transmission de quelques-uns de vos savoirs. Je vous en suis très reconnaissante.

J'associe Philippe Blanc à ces remerciements. Merci pour le suivi de ces travaux de thèse, les réunions d'avancement, les conseils et recommandations. Merci à la société TOTAL pour la confiance et le support qu'ils m'ont apporté.

Merci à l'équipe du Cedre et particulièrement à Stephane Le Floch et Camille Lacroix pour les dosages, les discussions associées ainsi que pour leur disponibilité.

Merci à Clémentine pour son accueil, pour son implication dans le projet et pour sa sympathie. Merci Jean Marc et Clothilde pour m'avoir accueilli aux Rivières Pilotes, votre travail et votre aide.

Un grand merci à Mohamedou pour son aide dans le traitement de toutes les données générées par la « valvo » et pour les conseils statistiques. Merci aussi pour ton écoute et ta bienveillance.

Merci à Mohcine pour m'avoir transmis quelques-unes de ses connaissances sur le son et la pollution sonore. Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et ton aide.

Merci Mickael pour tes enseignements en biologie moléculaire, ta patience et ton optimisme.

Merci à Pierre pour m'avoir initié à l'électronique et pour le suivi des « valvos ». Merci pour l'installation de la « sono » aux Rivières Pilotes malgré une pluie battante !

Merci à Olivier pour m'avoir permis d'enseigner à l'université.

Merci Patrice pour ton aide en biologie moléculaire. Un grand merci pour ton suivi, ton soutien et tes encouragements au fil des ans.

Merci à Bruno pour les journées recherche des corbicules sur le terrain et pour ta sympathie au quotidien.

Merci Floriane d'avoir pris le temps de m'initier aux dissections du ganglion viscéral de l'huitre.

Merci à Claire pour la qualité de son travail. Je te souhaite une très belle réussite !

Merci à Débora et Emilie, pour leur gentillesse respective et leurs conseils. Merci d'avoir fait vivre ce bureau pendant un temps.

Merci à Christian, Kevin et Jacques pour leur aide pratique et leur sympathie. Un merci tout particulier à Christian pour sa bienveillance.

Merci à Florence, pour son aide incontestable au cours de ces derniers mois et pour avoir si souvent fleuri mon bureau.

Merci à Christelle pour sa bonne humeur et pour avoir égayé nombreuses de mes journées.

Merci à Tiaré pour sa gentillesse et son soutien. Merci pour tous ces bons moments passés et pour tous ces jolis souvenirs finlandais. J'ai appris beaucoup de choses à tes côtés. Je te souhaite une belle réussite et tout le meilleur pour la suite.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'équipe, permanents ou non, que j'ai pu côtoyer au cours de ces années de thèse à la station marine : Cerise, Pierre-Yves, Nathalie, Fabien, Alexia, Laure, Agnès, Magalie, Régine, Damien, Sophie, Andrea, Zélie, Anthony, Fanny, Adeline, Laura, Anne.

J'adresse pour finir toute ma gratitude à ma famille, mes amis et Freddy.



# SOMMAIRE

RESUME _____	5
ABSTRACT _____	7
REMERCIEMENTS _____	9
<b>CHAPITRE 1 INTRODUCTION</b> _____	15
1.1 Contexte et objectifs de l'étude _____	17
1.2 Structure du manuscrit _____	19
<b>CHAPITRE 2 ETAT DE L'ART</b> _____	21
2.1 Monitoring comportemental des écosystèmes aquatiques _____	23
2.2 L'origine des pollutions pétrolières _____	26
2.3 Niveaux de contamination recensés _____	31
2.4 Réponse comportementale de mollusques bivalves en présence de pétrole brut _____	36
2.5 Perturbations physiologiques et cellulaires sous-jacentes _____	37
2.6 Les effets multistress _____	43
<b>CHAPITRE 3 MATERIELS ET METHODES</b> _____	47
3.1 Les mollusques bivalves _____	49
3.2 Démarche expérimentale et dispositifs utilisés _____	50
3.2.1 Expérimentation en conditions semi-naturelles _____	51
3.2.2 Expérimentations en conditions de laboratoire _____	55
3.3 L'analyse du comportement _____	61
3.3.1 La Valvométrie HFNI _____	61
3.3.2 Les principaux paramètres comportementaux étudiés _____	64

3.4 L'analyse des perturbations du milieu intérieur _____	65
3.4.1 Les tissus ciblés _____	65
3.4.2 L'analyse du protéome _____	69
3.4.3. L'analyse de gènes cibles _____	75
3.4.4 L'analyse de la contamination _____	78
<b>CHAPITRE 4 EFFETS DE LA POLLUTION SONORE CHEZ LES BIVALVES</b> ____	81
4.1 Introduction _____	83
4.2 Article: Noise pollution limits metal bioaccumulation and growth rate in a filter feeder, the Pacific oyster <i>Magallana gigas</i> _____	83
4.3 Conclusions du chapitre _____	105
<b>CHAPITRE 5 PERTURBATIONS COMPORTEMENTALES ET CONTAMINATION CHEZ DEUX MOLLUSQUES BIVALVES EXPOSES AU PETROLE BRUT DANS UN CONTEXTE MONO ET MULTISTRESS</b> _____	107
5.1 Introduction _____	109
5.2 Article: Asiatic clam <i>Corbicula fluminea</i> exhibits distinguishable behavioural responses to crude oil under semi-natural multiple stress conditions _____	110
5.3 Perturbations comportementales et contamination de l'huitre <i>M. gigas</i> exposée au pétrole brut en conditions multistress de laboratoire _____	122
5.3.1 Introduction _____	124
5.3.2 Résultats & Discussion _____	125
5.3.3 Conclusion _____	139
5.4 Conclusions du chapitre _____	142
<b>CHAPITRE 6 PERTURBATIONS SOUS-JACENTES AU COMPORTEMENT EN PRESENCE DE PETROLE BRUT SEUL</b> _____	145
6.1 Introduction _____	147

6.2 Article: Proteome changes in muscles, ganglia, and gills in <i>Corbicula fluminea</i> clams exposed to crude oil: relationship with behavioural disturbances _____	149
6.3 Analyse du protéome du ganglion viscéral de l’huitre <i>M. gigas</i> _____	151
6.3.1 Introduction _____	162
6.3.2 Résultats _____	163
6.3.3 Discussion _____	170
6.3.4 Conclusion _____	174
6.4 Conclusions du chapitre _____	175
<b>CHAPITRE 7</b> COMPORTEMENT, CONTAMINATION ET ANALYSE DU PROTEOME DE L’HUITRE EXPOSEE A UNE CONCENTRATION MASSIVE DE PETROLE BRUT _____	177
7.1 Introduction _____	179
7.2 Résultats et discussion _____	180
7.3 Conclusions _____	188
<b>CHAPITRE 8</b> DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS _____	191
8.1 Préambule _____	193
8.2 Résumé des principaux résultats _____	194
8.3 Mises en perspectives du comportement en présence de pétrole brut seul _____	196
8.4 Discrimination de la réponse comportementale au pétrole brut dans un contexte multistress _____	202
8.5 Relations entre activité valvaire et perturbations du milieu intérieur des bivalves exposés au pétrole brut _____	206
8.6 Les points clés retenus pour les aspects opérationnels _____	208
8.7 Perspectives de recherche _____	210
<b>CHAPITRE 9</b> REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____	213



# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION





## 1.1 Contexte et objectifs de l'étude

L'exploitation pétrolière est une source de perturbation des écosystèmes environnementaux aquatiques (GESAMP, 2007). Une surveillance efficace et fiable est indispensable et nécessite l'utilisation d'outils adaptés et spécifiques. Robuste, autonome et permettant un suivi en ligne et à distance, le biomonitoring par Valvométrie HFNI (Haute-Fréquence Non-Invasive) est une solution possible. Le principe consiste à suivre et numériser en continu le comportement et différents traits de vie (mortalité, agitation, croissance, ponte, rythmes biologiques...) de mollusques bivalves dans le milieu naturel à surveiller. Les données rendues lisibles automatiquement sur un site web dédié permettent de visualiser l'activité valvaire en temps quasi réel et donc de déceler la survenue potentielle d'évènements opérant sur la qualité du milieu (Andrade et al., 2016). De nombreuses études en conditions contrôlées de laboratoire ou en conditions semi-naturelles ont déjà rapporté le potentiel analytique de l'activité valvaire de mollusques bivalves avec la Valvométrie HFNI afin de traduire la présence d'éléments traces métalliques (Fournier et al., 2004 ; Tran et al., 2003, 2007), d'hypoxie (Tran et al., 2001, 2005), d'algues toxiques (Haberkorn et al., 2011 ; Tran et al., 2010), de pétrole brut (Bénégui et al., *in prep*), de pollution sonore (Charifi et al., 2017), ou encore de parasitisme (Chambon et al., 2007). En parallèle de mes travaux de thèse, deux valvomètres ont fonctionné en autonomie durant 14 mois (2017-2018) dans le golfe Arabo-Persique sous une plateforme pétrolière offshore en activité. Tandis que la croissance continue des huitres perlières locales a suggéré un écosystème en « bonne santé », leur comportement a traduit de façon transitoire la survenue d'évènements perturbateurs inhérents aux activités de la plateforme (Blanc et al., 2017). Dans ce contexte industriel, la possibilité de déceler spécifiquement une fuite accidentelle de pétrole dans le milieu naturel où de multiples perturbations sont envisageables se devait d'être considérée. Ce point constitue la première problématique de mes travaux de thèse : la retranscription du comportement de mollusques bivalves par la Valvométrie HFNI peut-elle permettre de détecter et de discriminer la présence de pétrole brut dans un milieu soumis à d'autres facteurs de stress ? La seconde problématique de mes travaux de thèse vient en complément puisqu'enregistrer des modifications comportementales de mollusques bivalves sans prendre en considération ou sans connaître les perturbations associées de leur milieu intérieur ne peut pas être satisfaisant et suffisant dans une démarche de biomonitoring

opérationnel. La question qui se pose alors est la suivante : lorsque le comportement de mollusques bivalves est perturbé par la présence de pétrole brut et analysé à distance avec la Valvométrie HFNI, quelles sont les perturbations physiologiques et cellulaires sous-jacentes correspondantes ? Que nous disent les comportements sur les perturbations du milieu intérieur ? *In fine*, le but visé est donc de pouvoir, en ligne et à distance, aboutir à une compréhension plus globale et précise de l'état de santé des mollusques bivalves instrumentés par la Valvométrie HFNI. Des analyses de la contamination et du protéome de différents tissus ciblés pour leurs relations avec le comportement ont été à ce titre entreprises.

Cette thèse est le fruit d'un travail universitaire financé par un industriel. Elle intervient dans le cadre de travaux réalisés depuis 2012 et d'une collaboration entre l'Université de Bordeaux, le CNRS et TOTAL sur l'utilisation de la Valvométrie HFNI développée par l'UMR CNRS EPOC 5805. Pour le chercheur l'objectif est l'application à un besoin de l'industrie mais aussi et tout d'abord l'application au problème de protection de l'environnement. Le but est d'aider l'industriel à être plus propre, de faire connaître ou reconnaître sa démarche grâce à un outil de mesure en temps quasi réel et en ligne. Dans cette optique, la valvométrie HFNI est un outil didactique, permettant de détecter des pollutions silencieuses et de dater leurs débuts, permettant d'informer le personnel sur la qualité de leur travail ainsi que les décideurs et toute partie prenante. Cette collaboration a également permis d'aborder des questions de recherche fondamentale sur l'écotoxicologie, la biologie des mollusques, et en particulier leur éthologie et leur physiologie. Elle nous a finalement donné l'accès à un site expérimental unique en France et à l'international, le site des Rivières Pilotes de TOTAL (Lacq, Pyrénées-Atlantiques) qui permet de travailler en conditions semi-naturelles en toute sécurité.

## 1.2 Structure du manuscrit

Ce manuscrit est construit autour d'articles. Certains sont publiés ( $n = 3$ ), d'autres sont en préparation ( $n = 3$ ). Après un **1<sup>er</sup> chapitre** d'introduction, le **Chapitre 2** propose un état de l'art autour des travaux présentés. Le **Chapitre 3** présente ensuite les matériels et méthodes avec lesquels ces travaux ont été réalisés. Les **Chapitres 4, 5, 6 et 7** constituent le corps du texte et mettent en lumière les résultats obtenus. Le **Chapitre 4** constitue un travail pionnier permettant de mieux comprendre les conséquences de la pollution sonore chez les bivalves. En effet, parmi les facteurs confondants que je devais étudier, l'un est très présent sur toutes les plateformes pétrolières. C'est la pollution sonore. Or on ne savait rien, ou presque rien, de l'impact possible de cette pollution sonore sur la biologie des mollusques bivalves. En collaboration avec un autre doctorant qui travaillait sur la mise en évidence des capacités auditives chez l'huître, j'ai étudié en quoi la biologie d'un mollusque bivalve pouvait être perturbée par le bruit. J'ai ensuite utilisé ces résultats, à deux niveaux de pression différents, dans mon étude des facteurs de stress potentiellement confondant en présence de pétrole brut. Ce chapitre fait l'objet d'un article scientifique publié dans PLOS One et pour lequel je suis en second auteur. Le **Chapitre 5** se subdivise en deux parties. La première présente les analyses comportementales et de contamination tissulaire chez la palourde d'eau douce *C. fluminea* exposée au pétrole brut seul ou en présence d'autres facteurs de stress au sein de conditions semi-naturelles. Cette partie fait l'objet d'un article scientifique publié dans Aquatic Toxicology et pour lequel je suis en premier auteur. Je me suis ensuite intéressée à l'huître *M. gigas* afin de savoir si mes résultats en eau douce, chez le corbicule, pouvaient avoir une valeur plus généraliste. La seconde partie présente donc, selon le même schéma, les analyses comportementales et de contamination de l'huître marine *M. gigas* exposée au pétrole brut seul ou en présence d'autres facteurs de stress en conditions contrôlées de laboratoire. Après ces premiers travaux, où l'on verra que la réponse comportementale au pétrole brut est caractéristique, je me suis focalisée sur les perturbations du milieu intérieur qui sous-tendent le comportement. Le **Chapitre 6** se subdivise en deux parties principales. La première partie présente les modifications du protéome des branchies et de l'ensemble muscles plus ganglions nerveux de *C. fluminea* exposée au pétrole brut seul en conditions semi-naturelles. Cette partie fait l'objet d'un article scientifique publié dans Aquatic Toxicology et pour lequel je suis en premier auteur. La seconde partie présente les perturbations du protéome dans le principal ganglion nerveux de l'huître également exposée

au pétrole brut seul en conditions de laboratoire. Finalement, dans le **Chapitre 7**, j'ai étudié les réponses de l'huitre à des concentrations « massives » de pétrole brut. Massives mais écologiquement réalistes puisqu'au niveau mondial ces concentrations peuvent être autorisées dans les eaux de production et qu'elles pourraient être retrouvées dans le cas de pollution. J'ai donc repris l'ensemble des paramètres étudiés au cours de mes travaux précédents (comportement, contamination, protéomique) pour évaluer les conséquences de telles concentrations sur l'huitre. Pour finir, le **Chapitre 8** permet de résumer l'ensemble des résultats et de mettre différents aspects en perspective.

# CHAPITRE 2

ETAT DE L'ART



## 2.1 Monitoring comportemental des écosystèmes aquatiques

La biosurveillance (ou biomonitoring) peut être définie comme l'ensemble des techniques utilisant des organismes vivants pour fournir des informations sur les composantes abiotiques (non vivantes) et biotiques (vivantes) de l'environnement (Day et al., 2000). Son but ultime est la préservation. En ce qui concerne le milieu aquatique, quelques-unes des meilleures approches pour répondre à la nécessité de surveillance sont représentées par les nouvelles technologies permettant l'obtention d'observations continues (Danovaro et al., 2016). Parmi ces technologies, celles se basant sur l'étude et la quantification des comportements *in situ* ont un fort potentiel pour servir de biomarqueurs de l'état de santé des écosystèmes (Bae et Park, 2014 ; Danovaro et al., 2016).

Le comportement est une réaction hautement intégrative des organismes dès l'échelle individuelle. Les réponses comportementales des organismes vivants résultent en effet de l'interaction cumulée de divers facteurs physiologiques internes et externes, environnementaux et sociaux (Dell'Omo, 2002 ; Gerhardt, 2007). Face à un stimulus, le comportement est un caractère largement modulable en termes de spécificité, d'intensité et de délai de réponse. C'est de ce fait un mécanisme adaptatif majeur, et premier\*, par lequel les animaux vont faire face aux changements quotidiens de leur environnement aussi bien qu'aux événements perturbants. Face aux changements, ces modifications comportementales peuvent indiquer (i), une réponse adaptative, afin d'atténuer ou de prévenir des effets potentiellement délétères d'une exposition, ou au contraire (ii) témoigner de l'échec des mécanismes adaptatifs et donc d'un effet toxique. Les comportements reflétant la toxicité « immédiate » sont souvent manifestes et rapidement observables alors que l'adaptation subtile peut être très fine et difficilement décelable. Elle demande en tout cas du temps pour la mettre en évidence. L'observation et la quantification des effets vont aussi grandement dépendre de l'approche expérimentale utilisée et, par voie de conséquence, une absence d'effet observé ne signifie pas toujours une absence d'effet (Dell'Omo, 2002 ; Weiss, 1994).

---

\* L'évitement est par exemple le premier mécanisme mis en jeu face à un stress ou une pression environnementale.



En ce qui concerne le mécanisme régissant la réponse comportementale, Scott et Sloman (2004) ont proposé un résumé des étapes se succédant (Fig. 2.1) : une fois le stimulus environnemental perçu, l'information sensorielle est intégrée centralement. Des réactions physiologiques secondaires peuvent alors survenir et, ensemble, les changements physiologiques centraux et périphériques façonnent les réponses comportementales aux stimuli. Les changements comportementaux peuvent ensuite, à leur tour, influencer les processus physiologiques et la réponse aux stimuli ultérieurs. En outre, une réaction comportementale inappropriée à un stimulus environnemental, due à un effet toxique par exemple, peut avoir de sévères conséquences pour les organismes.

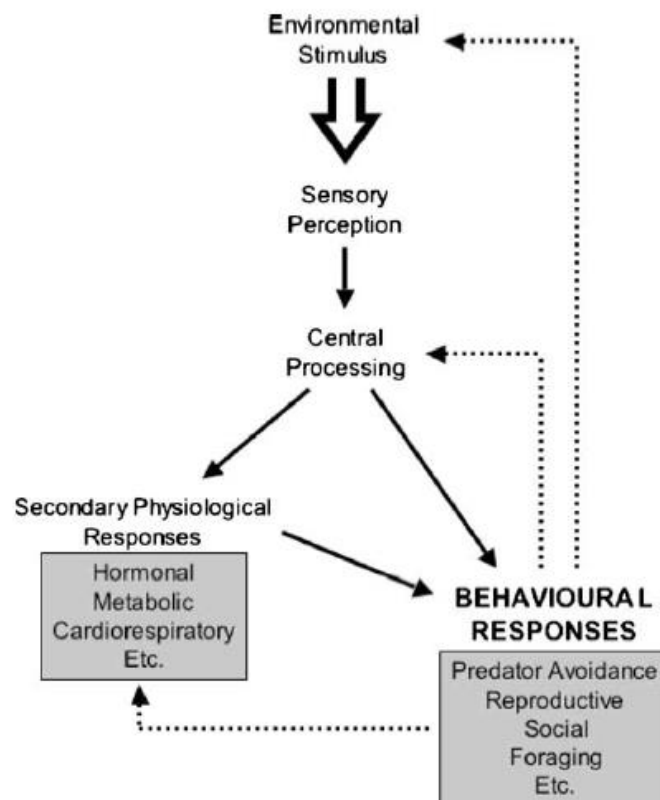


Figure 2.1. De nombreux facteurs physiologiques et environnementaux influencent le comportement chez le poisson (Scott et Sloman, 2004).

L'étude des changements de comportement des organismes face à un stress représente une part essentielle des sciences du comportement et de l'écotoxicologie, qu'on appelle l'écotoxicologie comportementale. Hellou (2010) en a signalé toute l'importance pour le

milieu aquatique. Cette thématique de recherche interdisciplinaire, à la croisée de trois grandes disciplines que sont l'éthologie, la toxicologie et l'écologie (Fig. 2.2), est considérée aujourd'hui comme une approche parfaitement fiable pour caractériser l'état de santé des organismes aquatiques et celui des écosystèmes dans lesquels ils évoluent (Pyle et Ford, 2017 ; Hartmann et al., 2016). De plus, l'analyse des comportements est considérée comme une branche ayant toujours un potentiel très prometteur dans les études écotoxicologiques, notamment pour combler le clivage pouvant parfois exister entre les études de laboratoire et celles en milieu naturel, entre les processus physiologiques et les processus écologiques (Amiard-Triquet, 2009 ; Gerhardt, 2007 ; Pyle et Ford, 2017 ; Scott et Sloman, 2004).

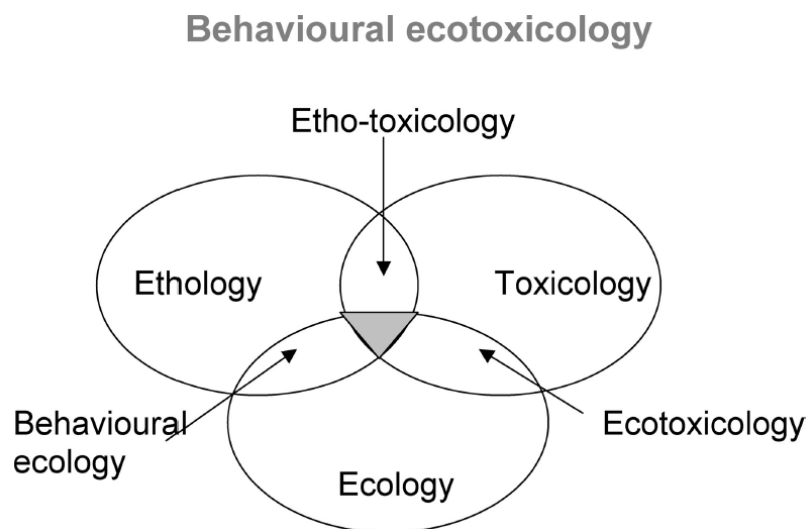


Figure 2.2. Interdisciplinarité de l'écotoxicologie comportementale (d'après Dell'Omo, 2002 ; Gerhardt, 2007)

Différentes limites sont cependant recensées au sein des études en écotoxicologie comportementale. Parmi elles, certaines sont en lien avec la méthodologie expérimentale. Parker (2016) souligne que les approches faisant appel aux tendances comportementales naturelles non conditionnées accroissent la fiabilité et la validité écologique des analyses. Elles sont à privilégier dans le cadre d'une normalisation méthodologique puisque de nombreuses variables confusionnelles peuvent influencer le comportement des animaux. D'autres limites concernent l'interprétation des réponses des organismes et les quiproquos qui peuvent en résulter. Par exemple, Tierney (2016) a mis clairement en évidence que les

réactions comportementales d'évitement face aux contaminants sont très répandues mais pas universelles. Diverses études ont relaté des cas où des poissons ont été attirés par la contamination. L'auteur explique que les organismes peuvent être « aveuglés » par d'autres problèmes. Ils peuvent être aussi dans l'incapacité de fuir le contaminant ou, cas extrême, préférer l'environnement toxique pour des raisons trophiques par exemple.

Dans le cas des mollusques bivalves, la fuite est bien sûr impossible (sauf le cas théorique de la coquille Saint-Jacques) et la réaction de fermeture des valves apparaît classiquement comme un comportement de protection des tissus à l'intérieur des valves. On pense souvent que face à un contaminant jugé comme nocif par l'individu exposé, il va se fermer pour se protéger. Nous verrons tout au long de ce travail que si les périodes de fermeture peuvent augmenter suite à une contamination, l'interprétation est plus complexe qu'une simple fermeture réflexe, qui durerait le temps que l'eau redevienne de bonne qualité.

## **2.2 L'origine des pollutions pétrolières**

Les pétroles bruts sont des substances formées naturellement au cours de processus géologiques et géochimiques spécifiques. Ce sont des mélanges complexes caractérisés par la présence de dizaines de composés hydrocarbonés en proportion majeure et de milliers de composés en proportion mineure ou à l'état de traces (Beens et Brinkman, 2000 ; Lefebvre, 1978 ; Stout et Wang, 2016 ; Tissot et Welte, 1984). La composition chimique variable des pétroles bruts est à l'origine de caractéristiques et de propriétés uniques qui vont influencer leur devenir dans le milieu naturel et leurs effets sur les organismes vivants (Ryerson et al., 2011 ; NRC, 2003).

Les éléments majeurs du pétrole brut, à savoir le carbone et l'hydrogène, y sont présents à hauteur de 97 %. Les composés mineurs, tels que l'azote, le soufre ou l'oxygène ne sont présents qu'à hauteur de 3 %. Les pétroles bruts peuvent également contenir des sels minéraux et des éléments traces métalliques (nickel, vanadium, chrome) en proportion négligeable (NRC, 1985). Les composés hydrocarbonés et apparentés du pétrole brut peuvent être subdivisés en différentes classes : les saturés, les oléofines ou insaturés, les

aromatiques, les polaires tels que les asphaltènes ou les résines (Colwell et al., 1977). Dans divers pétroles bruts, les composés saturés sont principalement des alcanes. Les oléofines ne se retrouvent en proportion importante que dans les produits raffinés du pétrole. Les hydrocarbures aromatiques peuvent représenter de 1 à 20 % du total des hydrocarbures présents dans le pétrole brut et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) de 0,2 à plus de 7 %. Dans la plupart des cas, les hydrocarbures aromatiques contenant de 1 à 3 cycles plus leurs dérivés (e.g. dibenzothiophène) représentent au moins 90 % des hydrocarbures aromatiques (Neff, 1990). Parmi l'ensemble des composés présents dans le pétrole brut, les HAP comprennent ceux qui provoquent les effets environnementaux les plus graves (Meador, 2003 ; NRC, 2003). Les BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène, xylène), composés monoaromatiques alkylés ou non, sont les composés les plus volatils et représentent généralement de 0,5 % à 5 % des pétroles légers (Wang and Fingas, 1996). En comparaison, l'essence peut en contenir jusqu'à 40 %. Du fait de leur volatilité, les BTEX rejetés dans l'eau sont rapidement transférés au milieu aérien. Il peut donc être considéré que la durée d'exposition des organismes aquatiques est souvent suffisamment courte pour éviter ou limiter leurs effets toxiques (NRC, 2003). Les BTEX sont généralement neurotoxiques et le benzène, en particulier, est reconnu comme un cancérogène avéré (ATSDR, 2007). Enfin, les proportions relatives des composés polaires contenant des atomes d'azote, de soufre ou d'oxygène participent également à déterminer les caractéristiques chimiques d'un pétrole brut donné.

Les divers intrants de pétrole brut dans le milieu marin peuvent être catégorisés en 4 groupes majeurs : les suintements naturels, l'extraction, le transport et la consommation (NRC, 2003). Les suintements naturels se produisent lors de la migration du pétrole brut vers la colonne d'eau sus-jacente. Il est estimé que ces fuites naturelles représentent le passage d'environ 600 000 tonnes de pétrole brut dans le milieu marin par an dans le monde. Comparativement, cela représente 45 % de l'ensemble des intrants pétroliers dans l'environnement (NRC, 2003 ; Fig. 2.3). Cependant, malgré ces chiffres, ces grands volumes sont libérés à un rythme suffisamment faible et diffus pour que l'écosystème soit en mesure de s'adapter.

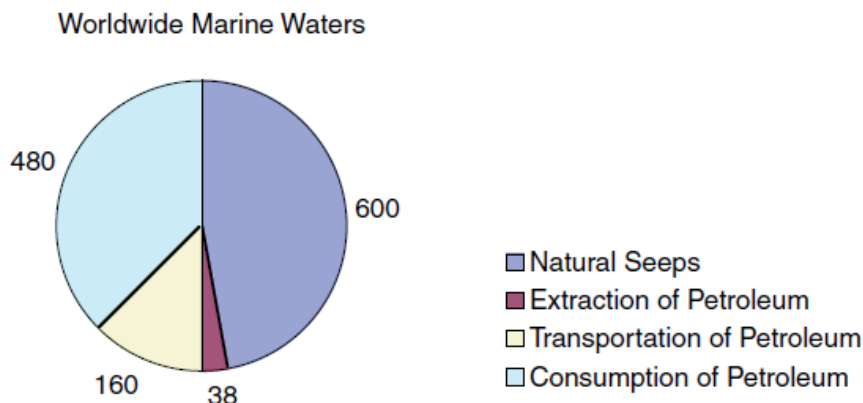


Figure 2.3. Contribution relative des rejets annuels moyens (1990-1999) d'hydrocarbures pétroliers (en kilotonnes) provenant des suintements naturels et des activités associées à l'extraction, au transport et à la consommation de pétrole brut ou de produits raffinés (NRC, 2003).

En ce qui concerne les principales sources liées aux activités anthropiques (extraction, transport et consommation), la consommation du pétrole est la source majoritaire. En moyenne, on estime que 480 000 tonnes d'hydrocarbures pétroliers sont introduites chaque année dans l'environnement marin à partir des rejets associés à la consommation du pétrole. Cela représente 70 % des pollutions pétrolières dues aux activités anthropiques et environ 40 % du volume de pétrole reçu par l'environnement marin. Ces apports au milieu marin se font presque exclusivement sous forme de rejets chroniques et lents, à partir du milieu terrestre, *via* les estuaires, les fleuves, les rivières, les eaux usées et/ou pluviales qui drainent les rejets de l'activité humaine.

La seconde source anthropique concernant les apports d'hydrocarbures au milieu marin est le transport du pétrole brut ou de ses produits raffinés. Elle entraîne le relargage de 150 000 tonnes d'hydrocarbures pétroliers par an, ce qui représente 22 % de l'apport mondial par les activités anthropiques. Malgré des volumes largement inférieurs à ceux des précédentes sources citées et, tout comme les rejets provenant de l'extraction du pétrole décrits ci-après, ces apports ne sont bien sûr pas négligeables. Ils peuvent, en effet, se produire sous la forme de grands déversements, partout où les navires-citernes peuvent se rendre et où les pipelines sont situés. Un point important est qu'ils ne sont souvent pas dilués au niveau global. Les produits déversés, si ce sont des distillats par exemple, peuvent se comporter de façon

spécifique dans l'environnement ou contenir une fraction importante de composés toxiques, tels que les HAP.

Enfin, en ce qui concerne l'ensemble des sources anthropiques de pétrole dans le milieu marin recensées ici, l'extraction est classée comme source minoritaire<sup>†</sup>. La nature et l'ampleur de ces rejets sont très variables et se limitent globalement aux zones où l'exploration / production du pétrole et du gaz est en cours. Ces activités introduisent, en moyenne 38 000 tonnes de pétrole brut dans le milieu marin chaque année, c'est-à-dire 5 % de l'apport anthropique mondial (NRC, 2003 ; Fig. 2.3). Bien qu'ils soient largement inférieurs à certaines autres sources de pétrole dans le milieu marin, ces apports ne sont pas négligeables pour autant. Ils peuvent représenter des déversements sporadiques mais importants, concentrés, et se trouver dans des zones sensibles, près de rivages par exemple. Plus précisément, les pollutions dues aux activités d'exploration production du pétrole et du gaz se subdivisent en 3 sous-catégories (Fig. 2.4) : les déversements accidentels à partir de plateformes offshore, les dépôts atmosphériques ainsi que les eaux de production. Les eaux de production sont un mélange de différents composés organiques et inorganiques dont de nombreux polluants, et représentent les déchets les plus importants de l'industrie pétrolière et gazière (Fakhru'l-Razi et al., 2009 ; Lusnier et al., 2019). À titre indicatif, tous pétroliers et pays confondus, les concentrations moyennes en hydrocarbures autorisées dans les eaux de production rejetées (avant dilution dans le milieu marin) sont d'environ 30 – 40 mg·L<sup>-1</sup> (Lusnier et al., 2019 ; OSPAR, 1992) avec des maximums journaliers autorisés de 100 mg·L<sup>-1</sup> (Tab. 2.1). Le pétrolier TOTAL limite la concentration à 30 mg·L<sup>-1</sup> en offshore et 15 mg·L<sup>-1</sup> en onshore<sup>‡</sup>.

---

<sup>†</sup> La grande exception est la catastrophe de *Deepwater Horizon*. On considère que son apport a été comparable à celui d'un an de fuite naturelle au niveau mondial. Les données présentées ici (1990-1999) n'en tiennent pas compte. *Deepwater Horizon* était une plateforme pétrolière située dans le Golfe de Mexique. La compagnie pétrolière britannique BP était propriétaire du puits. L'explosion de la plateforme s'est déroulée le 20 avril 2010 et son naufrage le 22 avril 2010.

<sup>‡</sup> <https://www.ep.total.com/fr/responsabilites/environnement/lenvironnement-au-coeur-de-notre-strategie>

Tableau 2.1. Tableau résumant les valeurs limites admises à travers le monde en termes de concentration de graisse et d'huile brute dans les eaux de production rejetées par les plateformes pétrolières (Lusinier et al., 2019 ; adapté de Zheng et al., 2016).

Location	Convention	Daily Maximum Discharge-Limit Value (mg/L)	Average Maximum Discharge-Limit Value (mg/L)
<b>Europe</b>			
North Sea	OSPAR Convention	–	30
Baltic Sea	HELCOM Convention	15	–
Mediterranean	Barcelona Convention	100	40
<b>Asia</b>			
Red Sea	Kuwait Convention	100	40
China	GB 4914-85	70	30–50
Indonesia	MD KEP 3/91; 42/97	100	75
Thailand	NEQA 1992: Gov. Reg. 20/90	100	40
Vietnam	Decision No. 333/QB 1990	–	40
<b>North America</b>			
United States	40 CFR 435	42	29
Canada	Act RSC 1987	60	30
<b>South America</b>			
Brazil	–	20	–
<b>Oceania</b>			
Australia	–	50	30

Environ 36 000 tonnes d'eaux de production sont déversées dans le monde chaque année, ce qui représente 95 % du volume des pollutions liées aux activités d'exploration production du pétrole et du gaz mais moins de 3 % de la quantité totale qui pénètre dans le milieu marin chaque année. Les déversements accidentels provenant des plateformes, généralement faibles, sont en moyenne de 3,5 tonnes. Ces déversements peuvent néanmoins avoir des répercussions importantes dans certaines circonstances. Enfin, les activités d'extraction entraînent le relargage de composés organiques volatils (COV) sous forme de gaz qui s'échappent dans l'atmosphère à partir du milieu marin. Ces dépôts atmosphériques provenant des activités d'extraction représentent 4 % des apports totaux mondiaux liés à l'extraction.

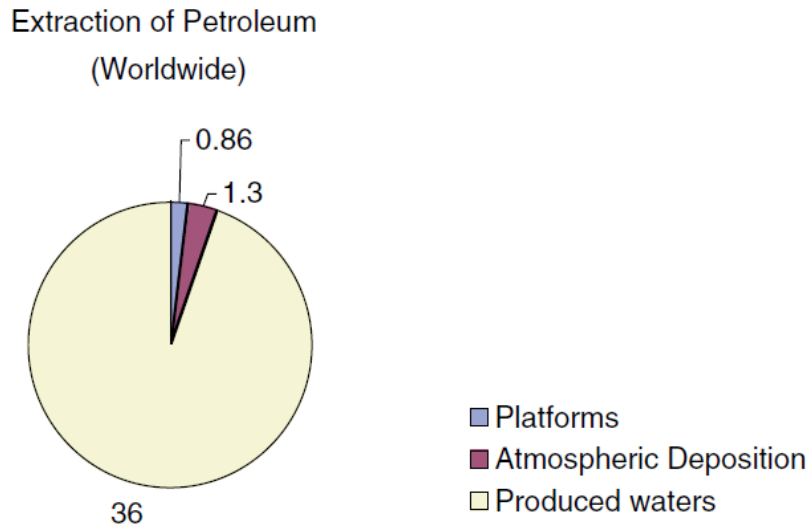


Figure 2.4. Moyenne relative des apports annuels (1990-1999) d'hydrocarbures pétroliers (kilotonnes) au milieu marin mondial provenant de sources associées à l'extraction du pétrole.

### 2.3 Niveaux de contamination recensés

Comme évoqué brièvement dans le paragraphe précédent, et bien que la notion de volume soit extrêmement informative, ces chiffres ne donnent pas directement d'information sur les conséquences pour le milieu aquatique. Les conséquences écologiques attribuables aux rejets de pétrole brut résultent en réalité d'un ensemble complexe de variables. Il doit être par exemple pris en compte les taux de relargage, la nature du fluide rejeté (et la proportion de composés toxiques qu'il contient), les caractéristiques physiques et biologiques des écosystèmes exposés et les conditions environnementales (NRC, 2003). Certains processus de base affectant le devenir du pétrole brut dans le milieu naturel, qu'ils soient d'origine physique, chimique ou biologique, sont bien référencés. Ces processus comprennent l'évaporation, l'émulsification, la dissolution, la photo-oxydation et l'oxydation microbienne (Colvin et al., 2020 ; Daling et al., 2014 ; Stout et Wang, 2016). À la suite d'un rejet, d'une fuite ou d'un suintement naturel, le transport du pétrole dans l'eau est un phénomène complexe qui évolue dans les trois dimensions, à la fois sur le plan vertical et sur le plan horizontal. Le transport horizontal s'effectue par étalement, advection, dispersion et entraînement tandis que le transport vertical comprend la dispersion, l'entraînement, la circulation de Langmuir, l'enfoncement, le partitionnement et la sédimentation. Dans ces



conditions d'hétérogénéité, définir des concentrations « typiques » dans les masses d'eau reste extrêmement complexe voire impossible car dénué de signification. Néanmoins, les valeurs ponctuelles mesurées, dans le temps et dans l'espace, n'en restent pas moins vraies. Elles sont représentatives de concentrations auxquelles les organismes vivants peuvent être confrontés, par périodes, malgré le fait que leur présentation puisse parfois paraître hétéroclite.

Les grands déversements occasionnels d'hydrocarbures attirent considérablement l'attention du public en raison des dommages environnementaux évidents et visuels qui en découlent. Dans ce type de circonstance, Sammarco et al. (2013) ont par exemple rapporté des valeurs de HCT (hydrocarbures totaux) et HAP de nombreux échantillons d'eau de mer ( $n = 66$ ) prélevés le long des côtes du Golfe du Mexique (de la Floride au Texas) entre mai et novembre 2010 à l'issue de l'explosion de la plateforme BP/Deepwater Horizon le 20 avril 2010. Les concentrations moyennes d'hydrocarbures totaux (C8 - C40) mesurées étaient de  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (pour des concentrations comprises entre 0 et  $11\,400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Les concentrations moyennes de HAP totaux étaient de  $47 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Les concentrations en HAP n'étaient cependant pas uniformes entre les différents groupes analysés. Les C1 phénanthrènes / anthracènes atteignaient une moyenne de  $1174 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  tandis que les concentrations des autres groupes étaient très nettement en deçà. Diercks et al. (2010) ont par ailleurs mis en évidence des concentrations de HAP allant jusqu'à  $189 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans le panache d'hydrocarbures généré au cours de cette catastrophe. En décembre 2007, le pétrolier Hebei Spirit a déversé environ 12 547 000 litres de pétrole brut au large de la côte ouest de la Corée, touchant plus de 375 km de côtes. À l'issue de ce déversement, les concentrations mesurées en HCT dans l'eau de mer variaient de 1,5 à  $7310 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Un mois plus tard, les concentrations mesurées étaient comprises entre 2,0 et  $224 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Kim et al., 2013). Entre 1996 et 2005, les concentrations mesurées en HCT dans la Baie de Bohai en Chine, qui est caractérisée par une activité humaine intense (décharges industrielles, ports maritimes, extraction de pétrole et de gaz) étaient comprises entre 23,7 et  $508 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Li et al., 2010). En Inde, dans le Golf de Cambay où l'un des plus grands chantiers de construction navale au monde est présent, les concentrations moyennes en HCT sont comprises, en fonction des stations et des saisons, entre 657 et  $3540 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Srinivasa Reddy et al., 2005). En 1996, Stagg et McIntosh, ont publié les résultats issus de deux campagnes de prélèvements réalisés en Mer du Nord en 1993 et 1994. Des concentrations maximales

de 3 et 4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ont été mesurées sur des stations de prélèvements relativement proches d'installations pétrolières et gazières. En ce qui concerne les eaux douces, saumâtres et côtières, Sousa et al. (2018) ont réalisé une méta-analyse de la littérature mondiale. La moyenne des concentrations de HAP est de l'ordre de 4,5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Par exemple, les concentrations atteignent des valeurs de 1,2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans la rivière Raba en Hongrie (Nagy et al., 2013), de 2,2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en République tchèque (Jálová et al., 2013), 1,2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en Chine (Zhang et al., 2017), de 1,9  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans la rivière Cauca en Colombie (Sarria-Villa et al., 2016) et jusqu'à 59,6  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en Iran (Agah et al., 2017). Guéguen et al. (2011) qui ont recensé les concentrations en HAP dans l'eau des côtes françaises ont montré qu'elles étaient comprises entre 0 et 8,5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Ces données sont en accord avec Incardona et al. (2014) qui parlent de concentrations environnementales réalistes de HAP totaux dans l'eau comprises entre 1 et 15  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Lorsqu'ils sont exposés à de l'eau de mer contaminée par des hydrocarbures, les animaux marins sont en mesure d'en accumuler une grande variété. En général, les hydrocarbures aromatiques s'accumulent davantage dans les organismes et sont retenus plus longtemps que les alcanes (Neff et al., 1976). L'analyse des concentrations en HAP dans les organismes ne doit cependant pas être considérée sans la mise en parallèle avec leur capacité de biotransformation (Bustamante et al., 2012). La biotransformation désigne l'ensemble des modifications subies par les molécules chimiques présentes dans les organismes. C'est grâce à ce processus, réalisé par différentes réactions enzymatiques, que les HAP parents, molécules hydrophobes et liposolubles, sont transformées en métabolites hydrophiles en mesure d'être excrétés par l'organisme. Ces capacités ont longtemps été ignorées ou considérées très faibles, voire inexistantes, chez les invertébrés aquatiques (Meador, 1995 ; Lee et al., 1972 ; Palmork et Solbakken, 1981). Des études plus récentes ont néanmoins démontré l'existence de cette capacité de métabolisation chez les invertébrés et notamment chez les mollusques bivalves (Livingstone, 1998 ; McElroy et al, 2000 ; Jenny et al., 2016). De surcroît, il a été mis en évidence que des mollusques provenant de sites fortement contaminés peuvent présenter de relativement faibles concentrations d'hydrocarbures aromatiques dans leurs tissus (Varanasi et al., 1985 ; Baumard, 1998). Néanmoins, les capacités de bioaccumulation des mollusques bivalves peuvent être plus élevées que celles d'autres invertébrés et sont largement supérieures à celles des vertébrés marins (Widdows et al., 1982 ; Neff, 2002 ; Martínez-Gómez et al., 2010). De façon générale, en plus de

capacités de métabolisation différentes selon les clades ou les espèces, les processus de bioaccumulation sont également régis par un ensemble de phénomènes complexes tels que par exemple, les durées et les voies d'exposition, les flux de contaminants, les cycles saisonniers ou encore les paramètres physico-chimiques du milieu qui peuvent modifier la biodisponibilité des composés. Les variations qui peuvent parfois exister entre les valeurs mesurées au sein des organismes peuvent donc logiquement en résulter (Douben, 2003). Enfin, les modifications comportementales, engendrées lorsque les résidus tissulaires s'approchent de niveaux critiques ou lors de la détection du contaminant, peuvent influencer aussi la contamination. Un facteur rarement pris en compte est finalement la ventilation qui peut être très variable suivant les conditions environnementales. Ingestion et ventilation peuvent donc également influencer la contamination.

Afin de donner un aperçu des valeurs recensées dans l'environnement, nous allons citer ici quelques exemples d'études. Webster et al. (2006) ont collecté des moules d'élevage (*Mytilus edulis*) chaque mois entre 1999 et 2005 sur un site naturel de la côte ouest-écossaise dans le but d'établir une gamme de concentrations de référence en prévision d'un incident environnemental. Les concentrations totales en HAP (2 à 6 cycles, parents et alkylés ; n = 39 composés) variaient de 12,5 à 151,2  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (poids frais). Galgani et al. (2011) ont analysé les concentrations en HAP (n = 16 composés) de moules *Mytilus galloprovincialis* transplantées durant 12 semaines au niveau de 123 sites longeant les côtes d'Espagne, de France, d'Italie, de Tunisie du Nord, d'Algérie et du Maroc. Les résultats ont indiqué des niveaux de contamination compris entre 22 et 106  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (poids sec). Ces données sont en accord avec celles de Luna-Acosta et al. (2015) qui ont transplanté des huitres *Magallana gigas* durant 3 mois dans la baie de Marennes Oléron et dans l'estuaire de la Gironde, en France, et qui ont relevé des concentrations en HAP (n = 31 composés) comprises entre  $80 \pm 32$  et  $236 \pm 43$   $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  (poids sec). Chez *M. edulis*, Rank (2009) rapporte des concentrations de 636  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (poids frais ; n = 19 composés) dans un port du Danemark considéré comme contaminé contre 32  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (poids frais ; n = 19 composés) dans un site de « référence ». En mer de Barents, Nahrgang et al. (2013) ont recensé des valeurs maximales de 22  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (poids frais ; n = 16 composés) chez *M. edulis* et comprises entre 5,7 et 17  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (poids frais ; n = 16 composés) chez *Chlamys islandica*. Enfin, de nombreux autres exemples sont proposés dans le tableau ci-dessous (Tab. 2.1).

Tableau 2.1. Exemples de concentrations en HAP mesurées chez des bivalves et invertébrés marins collectés en milieu naturel (Douben, 2003).

Species	Feeding mode	Area	Total PAH (ng/g)	Sites/PAHs	d-w	Reference	Type
<b>Mussels and oysters</b>							
<i>Mytilus edulis</i>	FF	Norway	500-12845	11/32	d	1	ws
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	FF	Mediterranean	25-390	23/14	d	2	ws
Mussels and oysters	FF	USA (all coasts)	77-1100*	214/24	d	3	ws
Mussels and oysters	FF	USA (all coasts)	192-503*	97-191/44	d	4	ws,my
<i>Mytilus edulis</i> ,	FF	Gulf of Naples, Italy	205	6/16	w	5	local
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	FF	Mediterranean, Spain	190-5490	6/ns	w	6	ws
<i>Mytilus edulis</i>	FF	Northern Baltic Sea	440	3/19	d	7	local
<i>Mytilus edulis</i>	FF	Finland (Archipelago Sea)	nd-150	7/7	w	8	ws
Mytilidae	FF	Gulf of Mexico, USA	36-7530	4/17	d	9	seep
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	FF	Greece	77-110	57/17	w	10	ws
<i>Crassostrea virginica</i>	FF	Florida, USA	361-11026	14/> 25	d	11	local
<i>M. edulis</i> , <i>M. galloprovincialis</i> and <i>C. gigas</i>	FF	France	nd-300000 <sup>¥</sup>	110/ns	d	12	ws, my
<i>Mytilus edulis</i>	FF	Netherlands	45-100	2/6	w	13	local, my
<i>Mytilus edulis</i>	FF	Scotland	54-2803	27/10	w	14	ws
<i>Mytilus edulis</i>	FF	Puget Sound, WA	40-63600	9/24	d	15	local
<i>Mytilus</i> spp.	FF	San Francisco Bay, CA	180-4100	6/34	d	16	local
<b>Benthic invertebrates</b>							
<i>Macoma balthica</i>	DF/FF	Scheldt, Netherlands	947 (449)	2/12	d	17	local
<i>Crangon crangon</i>	scav	Scheldt, Netherlands	410 (285)	2/12	d	17	local
<i>Nereis diversicolor</i>	omn	Scheldt, Netherlands	785 (409)	2/12	d	17	local
<i>Homarus americanus</i>	scav	Nova Scotia, Canada	235-73000	1/10	w	18	local, my
<i>Littorina littorea</i>	herb	Southern Norway	595-1430	4/27	d	1	ws
<i>Patella vulgata</i>	herb	Southern Norway	674-15462	2/31	d	1	local
<i>Asterias rubens</i>	pred	Southern Norway	325-458	2/19	d	1	local
<i>Macropopus tuberculatus</i>	omn	Spain	60-930	6/ns	w	6	ws

Les valeurs sont données sous la forme de gamme de concentrations ou de concentrations moyennes, certaines avec des écarts-types entre parenthèses. Sites/PAHs représente le nombre de sites échantillonnés et le nombre de HAP analysés. nd, non détecté ; ns, non précisé ; d-w, indique poids sec (d, « dry ») ou poids frais (w, « wet ») ; \*15e-85e percentile ; #, valeurs moyennes annuelles ; ¥, moyenne pour la plupart des stations = 3-5 ppm. « Type » désigne le type d'échantillonnage ; ws, généralisé ; my, pluriannuel ; seep, zones de suintement naturel de pétrole. Les types d'alimentation sont : DF, dépositivore ; FF, filtreur ; Omn, omnivore ; herb, herbivore ; Pred, prédateur. Toutes les études ont analysé les tissus mous d'organismes entiers, sauf la référence n°16 (hépatopancréas). Les études comprennent des échantillons provenant de zones peu à très contaminées. 1, Knutzen and Sortland (1982) ; 2, Baumard et al. (1998) ; 3, O'Connor (2002) ; 4, NOAA (1998) ; 5, Cocchieri et al. (1990) ; 6, Porte et Albaiges (1993) ; 7, Broman et al. (1990) ; 8, Rainio et al. (1986) ; 9, Wade et al. (1989) ; 10, Iosifidou et al. (1982) ; 11, Fisher et al. (2000) ; 12, Claisse (1989) ; 13, Stronkhorst (1992) ; 14, Mackie et al. (1980) ; 15, Krishnakumar et al. (1994) ; 16, Miles and Roster (1999) ; 17, Stronkhorst et al. (1994) ; 18, Uthe and Musial (1986).

## 2.4 Réponse comportementale de mollusques bivalves en présence de pétrole brut

La littérature est globalement peu documentée sur l'étude du comportement de mollusques bivalves face à un pétrole brut. De plus, parmi cette littérature, certaines études ne se sont focalisées que sur la faisabilité de détection de pétrole brut par les mollusques bivalves sans s'attacher à décrire les caractéristiques de leur réponse comportementale. C'est le cas de Kramer et al. (1989) qui ont mis en évidence la faisabilité pratique de détection de pétrole brut à une concentration  $< 6000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  avec la moule marine *Mytilus edulis* en conditions de laboratoire et, plus récemment, de Dragsund et al. (2013) pour des concentrations de pétrole brut  $\geq 180 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans un contexte de détection de fuite en milieu naturel. Quelques études ont cependant analysé l'activité valvaire de mollusques bivalves durant une contamination par un pétrole brut et ont caractérisé la réponse au travers de différents paramètres comportementaux. Parmi elles, Redmond et al. (2017) ont décrit le comportement de la moule marine *Mytilus edulis* face à un pétrole brut léger de Mer du Nord, en conditions contrôlées de laboratoire durant 4 jours, à 3 concentrations nominales différentes :  $15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et  $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  avec une température de l'eau de  $13 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $n = 6$  moules par condition). Les paramètres comportementaux étudiés sont la distance parcourue par les valves, l'amplitude d'ouverture et le temps passé par les valves à différents degrés d'ouverture. Les résultats montrent une réduction statistiquement significative de l'amplitude d'ouverture des moules aux deux concentrations d'exposition les plus élevées ( $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et  $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Bénégui et al. (*in prep*) ont étudié le comportement de la palourde d'eau douce, *Corbicula fluminea*, face à différentes concentrations nominales de pétrole brut de Mer du Nord (0, 10, 100, 500 et  $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) durant 10 jours en conditions semi-naturelles avec une température de l'eau comprise entre  $11$  et  $14 \text{ }^\circ\text{C}$ . Les auteurs ont mis en évidence une diminution de l'amplitude d'ouverture ainsi qu'une augmentation des durées de fermeture des corbicules qui était fonction des concentrations d'exposition, et ce, dès  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . D'autres études ont été réalisées en conditions de laboratoire chez des mollusques bivalves avec des concentrations beaucoup plus élevées. Swedmark et al. (1973) ont écrit qu'une contamination de  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  avec du pétrole brut de l'Oman (96 h ;  $10 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) n'altérerait pas la capacité de fermeture des valves du pétoncle *Pecten opercularis* et de la moule *Mytilus edulis*. Stainken et al. (1979) avaient par contre rapporté une dépression de

la contraction musculaire avec une augmentation de la sécrétion de mucus chez le bivalve marin *Mya arenaria* exposé durant 96 h à différentes concentrations de pétrole brut de Louisiane (50 à 800 mg·L<sup>-1</sup> ; 4° et 14 °C). De plus, Hartwick et al. (1982) ont réalisé des contaminations de la palourde marine, *Protothaca staminea*, pendant 5 h / jour durant 5 jours avec 100 et 1000 mg·L<sup>-1</sup> de pétrole brut d'Alberta et ont rapporté deux panels de réponses comportementales distinctes. A 100 mg·L<sup>-1</sup>, les valves des palourdes étaient étroitement fermées et, lorsqu'elles s'ouvraient, la réaction de rétractation des siphons était normale. A 1000 mg·L<sup>-1</sup>, la réaction de rétractation des siphons était lente et une large béance de la coquille était observée lors de l'exposition à l'air. Cette large béance pouvait être suivie d'une fermeture des valves avec, parfois, le pincement des siphons à l'extérieur de la coquille.

## **2.5 Perturbations physiologiques et cellulaires sous-jacentes**

Selon Seyle (1950), le stress se définit comme « la réponse non spécifique de l'organisme à toute demande qui lui est faite ». L'universalité des réponses biologiques du monde vivant est un point central de la biologie moderne et de la médecine. C'est aussi le prérequis de base du syndrome d'adaptation général au stress (« General Adaptation Syndrome », GAS) qui décrit les réactions fondamentales déclenchées chez tous les organismes face à un agent stressant, quelle qu'en soit sa nature (Chrousos, 1998 ; Seyle, 1946, 1950). La première phase du GAS est la phase dite d'alarme. Cette phase caractérise la réaction immédiate de l'organisme face à l'exposition soudaine à un stimulus auquel il n'est pas adapté. Elle est initiée par le système nerveux central qui induit la libération d'hormones et provoque un apport énergétique important vers les muscles en vue d'une préparation à l'effort, au combat ou à l'évitement. La seconde phase est la phase de résistance. Elle intervient lorsque l'organisme est exposé de façon continue et « s'adapte », se défend. La résistance à l'agent stressant spécifique est accrue au « détriment » de la résistance à d'autres agents. Enfin, la dernière phase est la phase d'épuisement qui apparaît lorsque l'exposition à l'agent stressant est prolongée et que les processus d'adaptation ne sont plus en mesure d'être maintenus par l'organisme. C'est lors de cette dernière phase que les processus tels que l'alimentation, la croissance, la reproduction et la survie sont altérés.

Tenter d'estimer et d'évaluer les conséquences des agents stressant sur les écosystèmes et les organismes sont des défis majeurs. Et ce sont des défis d'autant plus importants dans la phase d'agression des écosystèmes que nous connaissons depuis de nombreuses années. Dans ce contexte, les marqueurs bioénergétiques peuvent aider, d'une part, en « synthétisant » les effets de multiples perturbations subis par les organismes et, d'autre part, en permettant la distinction entre un stress modéré compatible avec la survie à long terme et un stress plus extrême non tenable par les individus et les populations. Avec des niveaux croissants de stress environnementaux, ces marqueurs reflètent le déclin progressif des organismes, c'est-à-dire le déclin de l'énergie et des capacités métaboliques restantes (ASc, « aerobic scope ») après que les coûts de maintenance de base de l'organisme sont satisfaits. Au cours de l'exposition à un stress modéré, l'ASc est positif mais réduit. Cette réduction peut être due (i) aux coûts élevés du métabolisme basal, (ii) à l'activation des mécanismes de protection et de réparation des dommages induits, (iii) à la réduction de l'assimilation des nutriments, et/ou (iv) aux impacts induits par le stress sur les voies produisant l'ATP. Lorsque l'ASc tend à disparaître, c'est-à-dire lorsque toutes les ressources énergétiques et métaboliques disponibles sont utilisées pour soutenir la maintenance de base, une dépression du taux métabolique s'installe. *In fine*, les processus de croissance ou de reproduction des individus voire de survie des populations sont altérés (Halsey et al., 2018 ; Sokolova, 2013). De plus, la réduction de l'ASc, qui peut être considérée comme une perte de souplesse énergétique des animaux, est en mesure d'entraîner la diminution de leur capacité à s'adapter à d'autres variations naturelles ou perturbations de leur environnement (Davoodi et Claireaux 2007). Chez diverses espèces, y compris chez les poissons et les invertébrés, l'exposition aux hydrocarbures pétroliers est en mesure de provoquer ce type de perturbation (Khursigara et al., 2019 ; Whitehead, 2013).

Au niveau subcellulaire, Anderson et al. (2015) ont proposé un modèle consensus des réponses mises en place lors de l'exposition à différents stress environnementaux, dont l'exposition à des hydrocarbures pétroliers. Cette étude, qui propose une méta-analyse de la littérature chez l'huître, montre l'existence d'un certain nombre de systèmes clés constamment impliqués dans les réponses face à une large gamme de stress environnementaux. Les données appuient un modèle consensus qui décrit une réponse générique au stress intracellulaire chez les huitres (Fig. 2.5). Ce modèle souligne l'importance de la chaîne mitochondriale de transfert des électrons et de la synthèse d'ATP

associée, des enzymes antioxydantes, des protéines chaperonnes et des protéines du cytosquelette.

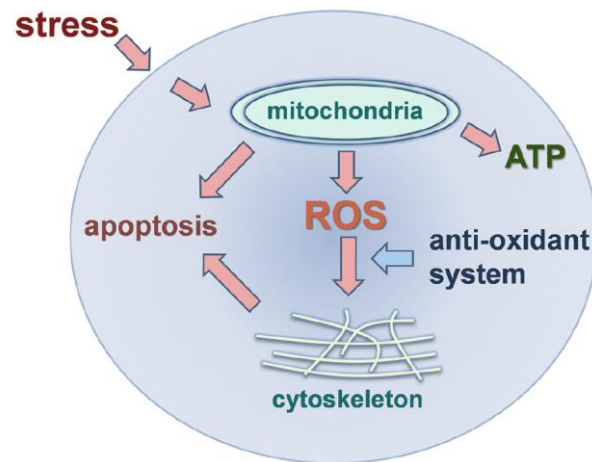


Figure 2.5. Modèle consensus des réponses intracellulaires au stress régulées de façon différentielle chez l'huître. Dans ce modèle, les réponses intracellulaires adaptatives font intervenir la production d'énergie (ATP) par la chaîne mitochondriale de transfert des électrons, la production anormale d'espèces réactives de l'oxygène, le système antioxydant, le cytosquelette, les membranes mitochondriales, le mécanisme apoptotique (mort cellulaire programmée ; Anderson et al., 2015).

Bien que le pétrole soit un mélange complexe de milliers de composés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont les constituants qui entraînent la toxicité chez la plupart des organismes (Carls et al., 2008 ; Incardona et al., 2006). Les HAP sont subdivisés en différentes sous-classes en fonction du nombre de cycles qu'ils contiennent. Leurs propriétés et la toxicité qu'ils sont en mesure de provoquer sont grandement liées à ce nombre de cycles.

En général, les produits pétroliers sont enrichis avec des HAP de faible poids moléculaire contenant deux ou trois cycles. Il est estimé que les HAP contenant de 2 à 4 cycles benzéniques sans groupement fonctionnel n'ont pas de toxicité spécifique et agissent en perturbant la fluidité des membranes *via* un mécanisme narcotique (Di Toro et al., 2000). La narcose se définit comme une perturbation non spécifique et réversible du fonctionnement des membranes biologiques (i.e. bicouches lipidiques), du fait de l'accumulation de contaminants au sein de ces phases hydrophobes. La perturbation des membranes entraîne une diminution de l'activité des organismes et de leur capacité à réagir



aux stimuli (van Wezel et Opperhuizen, 1995). Elle s'apparente à une anesthésie. Ni interaction chimique ou récepteur spécifique n'est donc en cause dans la narcose. Si une substance chimique est suffisamment bioaccumulée, elle peut en être à l'origine, à moins que la toxicité narcotique ne soit masquée par d'autres effets toxiques spécifiques de la substance en question (Könemann, 1981 ; Veith et al., 1983). Par conséquent, il est considéré que la narcose correspond au niveau minimal de toxicité qui peut être exercé par toute substance. À ce titre, la narcose peut également être appelée « toxicité de base » (Escher et al., 2002). Concernant les HAP, les résultats sont fondés sur la relation linéaire établie entre les concentrations létales de HAP pour 50 % des organismes (CL<sub>50</sub>) et l'hydrophobicité exprimée sous la forme du logarithme du coefficient de partage octanol eau, Kow (Di Toro et al., 2000). C'est une démarche similaire aux études classiques établissant un lien entre pouvoir anesthésique et hydrophobicité. Les modèles décrivant cette relation supposent que les composés soient absorbés de façon passive par les organismes (McCarty et al., 1993). Les composés avec un log Kow supérieur ou égal à 5,6 (French-McCay, 2002) ne présenteraient pas de toxicité de type narcotique du fait d'une biodisponibilité insuffisante. De façon cohérente, Sverdrup et al. (2002) indiquent que seuls les HAP avec un log Kow inférieur ou égal à 5,2 suivraient un mode de toxicité narcotique. Ils ajoutent que la toxicité est additive dans le cas du mélange des composés.

Les HAP de poids moléculaire plus élevé comprennent de nombreux composés qui sont des agonistes du récepteur nucléaire Ah (AhR, « Aryl Hydrocarbon Receptor »). AhR agit en tant que facteur de transcription et intervient dans la régulation de nombreux gènes dont ceux des enzymes métabolisant les xénobiotiques, comme les formes 1A et 1B du cytochrome P450 (Hahn, 1998). La métabolisation ou biotransformation des HAP permet de générer des métabolites moins hydrophobes qui peuvent être plus facilement excrétés par l'organisme *via* la bile ou l'urine. La phase I comprend des enzymes de la famille du cytochrome P450 qui, par des processus d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse, vont agir sur les hydrocarbures hydrophobes en les rendant plus solubles dans l'eau. Chez les mollusques bivalves, une surexpression des formes 3 et 4 a été signalée par plusieurs études suite à une exposition à des HAP ou à un pétrole brut (Ertl et al., 2016 ; Miao et al., 2011 ; Piazza et al., 2016 ; López-Landavery et al., 2019). Dans la phase II, aussi appelée phase de conjugaison, des enzymes telles que la glutathion S-transférase ou des sulfotransférases lient les métabolites de la phase I à des substrats polaires endogènes, augmentant ainsi leur

solubilité et facilitant leur excrétion (Bustamante et al., 2012 ; Lacroix et al., 2014). Enfin une phase III, qui correspond à l'excrétion des composés conjugués hors de la cellule par des transporteurs spécifiques, peut être identifiée (Van der Oost et al., 2003). De façon paradoxale, ces processus de biotransformation peuvent également être à l'origine d'intermédiaires réactionnels pouvant être plus dangereux sur le plan biologique que les composés parents. C'est ce processus que l'on appelle la bioactivation (Schlenk et al., 2008). Les métabolites électrophiles issus de la phase I de la biotransformation sont en mesure d'induire un stress oxydant et de provoquer des adduits à l'ADN (Santana et al., 2018). *In fine*, les dommages génotoxiques provoqués peuvent entraîner les cellules vers l'apoptose, c'est-à-dire la mort cellulaire programmée, ou les conduire vers les processus de cancérogenèse (Colvin et al., 2020).

En ce qui concerne le recensement des effets du pétrole brut et/ou des HAP sur les fonctions physiologiques des organismes vivants, Pasparakis et al. (2019) ont synthétisé les résultats de nombreuses études récentes réalisées à la suite de l'explosion de la plateforme BP/Deepwater Horizon. Ils concluent que le pétrole brut en altère de nombreuses, est multicolore et multiorgane avec des différences de sensibilité marquées entre espèces. Sur les 15 espèces dont les réponses ont été caractérisées, 20 % présentent des effets à des concentrations ( $\Sigma\text{HAP}_{50}$ ) inférieures à  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans l'eau tandis que 50 % présentent des effets à des concentrations ( $\Sigma\text{HAP}_{50}$ ) inférieures à  $8,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans l'eau. La Figure 2.6 met en évidence les différentes fonctions atteintes par le pétrole brut et référencées par cette méta-analyse de la littérature.

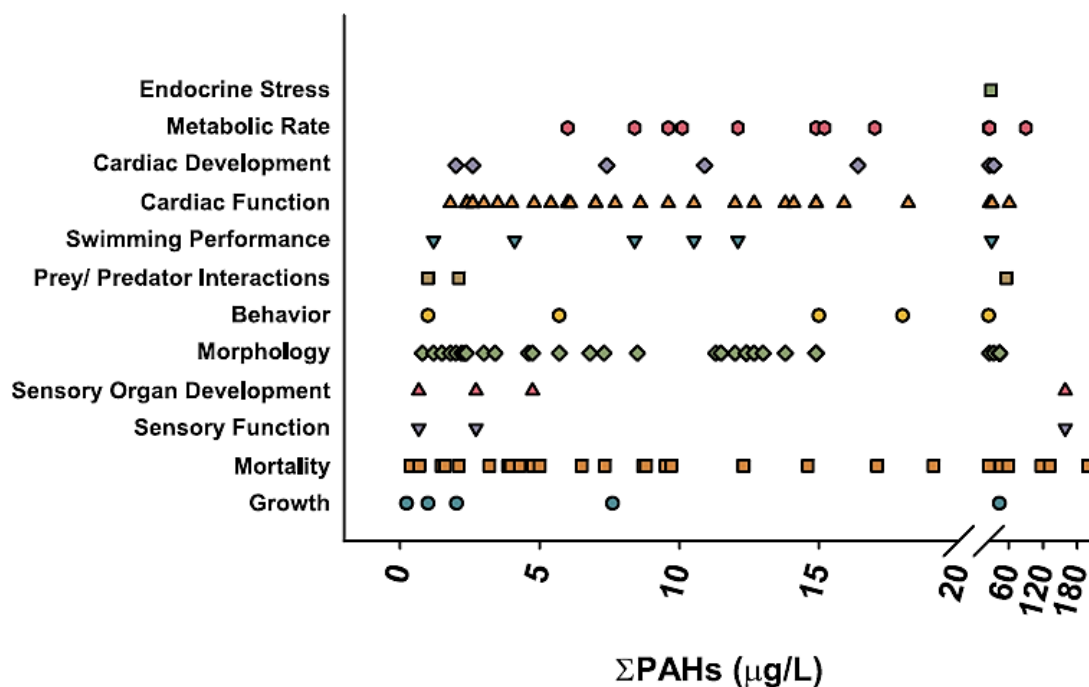


Figure 2.6. Effets signalés pour différentes espèces de poissons en fonction de concentrations d'exposition en HAP (Pasparakis et al., 2019). Chaque point représente la plus faible concentration ayant causé un impact significatif dans une catégorie d'effet et dans une étude spécifique. Une publication peut être incluse dans plus d'une catégorie. Les études portant sur plusieurs espèces peuvent être comptées plusieurs fois dans différentes catégories.

Les mécanismes à l'origine des modifications comportementales en présence de pétrole sont globalement mal compris chez les organismes aquatiques. Certaines modifications seraient une conséquence secondaire de la cardiotoxicité alors que d'autres impliqueraient la présence sous-jacente de mécanismes neurotoxiques. Ces mécanismes ne sont encore que relativement peu étudiés (Hauser-Davis et al., 2019). Par exemple, l'exposition des premiers stades de vie de poissons entraîne des anomalies importantes du tissu neural, des modifications de l'expression de différents gènes indiquant une quantité réduite de ce tissu, sa dégénérescence ou encore de perturbations de voies impliquées dans la plasticité synaptique (Xu et al., 2016, 2017). En ce qui concerne les organismes matures, Gesto et al. (2006, 2008) ont mis en évidence la capacité de certains HAP à perturber la voie des neurotransmetteurs acétylcholine, dopamine et sérotonine. Plus récemment Hauser-Davis et al. (2019) ont mis en évidence l'inhibition de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase issue du cerveau d'une espèce de mulot exposée à des HAP.

## 2.6 Les effets multistress

Dans l'environnement, les organismes ne sont bien évidemment pas soumis à un unique facteur de stress : on parle de contexte de stress multiples ou multistress. Les conséquences des nombreuses combinaisons possibles de facteurs de stress peuvent être complexes et variées. On parle par exemple d'effets additifs lorsqu'ils s'additionnent, d'effets synergiques lorsqu'ils se multiplient ou encore d'effets antagonistes lorsqu'ils s'atténuent (Crain et al., 2008 ; Piggott et al., 2015). Jackson et al. (2016), dans une méta-analyse de la littérature existante en eau douce, ont montré que les effets les plus souvent répertoriés étaient les effets antagonistes. Néanmoins, l'analyse plus large de la littérature en eau douce, en eau de mer et dans les eaux souterraines réalisée par Nõges et al. (2016) rapporte que relativement peu d'études montrent des preuves quantitatives des effets multistress malgré l'existence de larges connaissances conceptuelles. Selon les auteurs, les effets des stress multiples ne sont pas correctement évalués pour plusieurs raisons : (i) les descripteurs des facteurs de stress ne sont pas encore totalement harmonisés ce qui entrave les analyses à grande échelle, (ii) l'information biologique collectée n'est pas forcément appropriée (insensible) pour analyser les effets de stress combinés, et (iii) les données collectées n'ont pas une résolution spatiale ou temporelle suffisante pour détecter les effets des facteurs de stress.

A notre connaissance, il n'existe pas d'étude concernant l'effet du pétrole brut en conditions multistress sur le comportement de mollusques bivalves. Des modèles conceptuels sont cependant proposés dans la littérature en ce qui concerne les conséquences de l'exposition des organismes aquatiques au pétrole brut en présence d'autres facteurs de stress (Fig. 2.7 ; Khursigara et al., 2019 ; Whitehead, 2013).

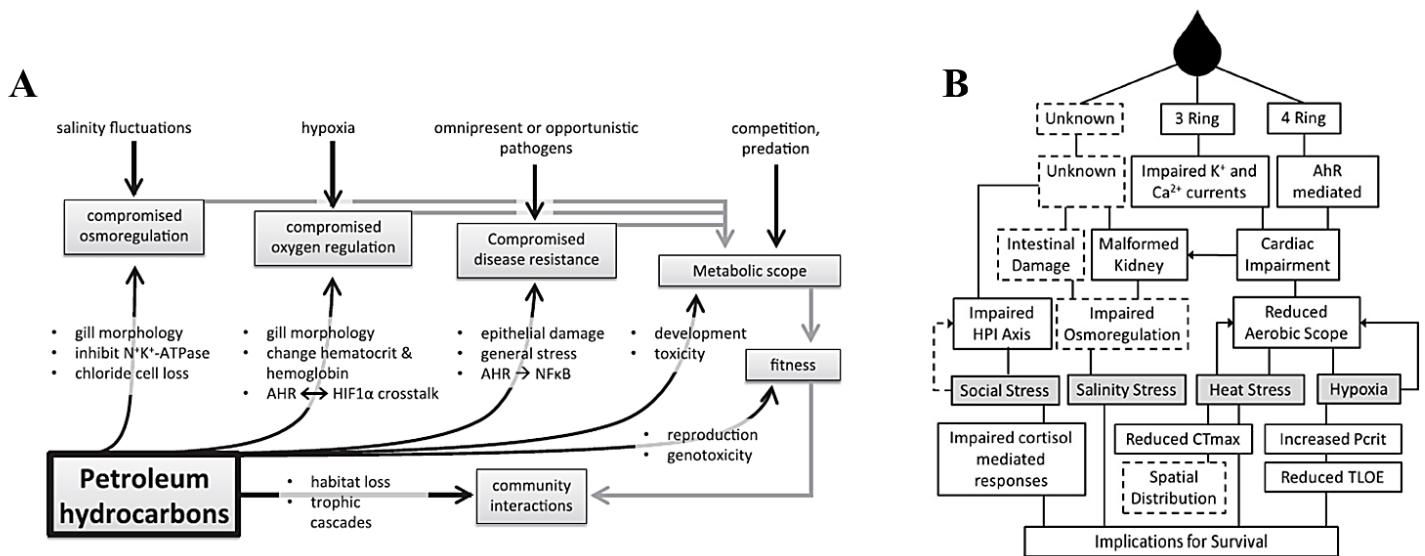


Figure 2.7. Modèles des interactions entre les hydrocarbures pétroliers et d'autres facteurs de stress. (A) Les facteurs de stress (rangée du haut) sont reliés par des flèches noires aux fonctions physiologiques altérées par les interactions avec les hydrocarbures pétroliers. Les hydrocarbures pétroliers sont reliés aux effets physiologiques par les flèches noires restantes. Les mécanismes qui sous-tendent les interactions entre les hydrocarbures pétroliers et les autres facteurs de stress sont énumérés et superposés au-dessus des flèches noires. Les flèches grises indiquent les répercussions aval (Whitehead, 2013). (B) Effets du pétrole sur la tolérance aux autres perturbateurs. La goutte noire représente le pétrole tandis que les cases grises indiquent les autres facteurs de stress. Les cases et les lignes en pointillée représentent les voies et effets nécessitant des investigations supplémentaires. 3 Ring, 4 Ring – Sous-classes de HAP avec leur nombre de cycles benzéniques, AhR - Aryl hydrocarbon Receptor, HPI - hypothalamus-pituitary-interrenal, CTmax – critical thermal maximum, Pcrit – critical oxygen pression, TLOE – time to loss of equilibrium (Khursigara et al., 2019).

Dans le cadre de nos travaux, nous considérons qu'il est nécessaire d'attacher une importance particulière non seulement à la nature mais aussi à l'intensité des différents facteurs de stress appliqués en présence de pétrole brut. Les situations multistress peuvent être résumées par la Figure 2.8 ci-dessous où chaque stress a été représenté par une flèche. Sur chaque flèche, le point symbolise la force du stress (la concentration par exemple). La situation finale sera la résultante de l'ensemble des forces représentées par chacun des points sur chacune des flèches. Nous avons choisi de travailler à différentes pressions ou concentrations de pétrole brut et d'autres facteurs de stress. L'ensemble des facteurs de stress et leurs concentrations ou pressions ont été choisis pour être écologiquement réalistes. Dire ou voir qu'un facteur de stress seul n'a pas d'impact sur l'activité valvaire d'un bivalve ne veut pas dire qu'il n'a pas d'effet ou qu'il est « inefficace ». Par contre, cela veut dire qu'à la concentration choisie et dans les conditions étudiées (i), ce facteur de stress n'a pas

eu de conséquences sur l'activité des valves des bivalves et (ii), qu'il n'a probablement pas masqué la réponse comportementale au pétrole brut lorsqu'elle existe. Si les concentrations ou pressions avaient été différentes, on peut bien sûr imaginer que la réponse comportementale globale aurait pu être différente ou pour le moins modulée. Cette relation à la concentration pourrait paraître triviale tellement elle est évidente mais on ne la voit pas souvent évoquée dans la littérature sur la problématique multistress.

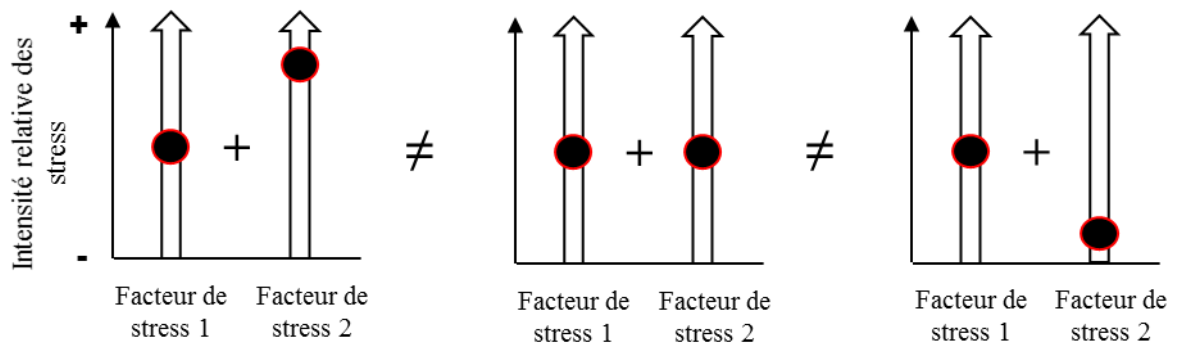


Figure 2.8. Combinaison de deux facteurs de stress avec des intensités différentes. Chaque situation est unique. Les flèches représentent les facteurs de stress. Chaque point représente l'intensité du facteur de stress correspondant.



# CHAPITRE 3

MATERIELS ET

METHODES





### 3.1 Les mollusques bivalves

Les mollusques bivalves sont considérés depuis plusieurs décennies comme des espèces d'intérêt pour la surveillance des milieux aquatiques (Goldberg, 1978). Ils sont reconnus comme écologiquement pertinents du fait de leur sédentarité, de leur abondance, de leur large répartition à l'échelle du globe et des masses d'eau, de leur disponibilité toute l'année, ou encore du fait de leur autonomie alimentaire puisque ce sont des animaux filtreurs. Ils sont également pertinents à étudier pour l'homme et ses activités, puisqu'ils représentent une ressource économique importante, *via* leur pêche ou leur élevage pour la consommation alimentaire, pour la perliculture et la nacriculture, ou simplement pour leur coquille utilisée à des fins d'ornementation par de nombreuses populations à travers le monde.

Les mollusques bivalves sont des organismes filtreurs qui ventilent l'eau au travers de leur cavité branchiale pour se nourrir d'une part, et pour assurer les échanges d'oxygène et de gaz carbonique entre l'eau et leur milieu intérieur d'autre part. L'activité ventilatoire est une étape limitante primaire qui va contrôler leur alimentation et leur respiration autant que leur éventuelle contamination (Massabuau et al., 1991 ; Tran et al., 2000, 2003). Rappelons que chez l'animal à respiration aquatique en condition de repos, la cavité branchiale doit être considérée comme une antichambre dans laquelle un faible renouvellement d'eau est généré. En conséquence, le tissu branchial et le sang ou hémolymphe qu'il contient sont confrontés à de plus faibles niveaux d'oxygénation que ceux de l'eau du milieu environnant (Massabuau et Abele, 2012). Ce mécanisme est le mécanisme de base qui permet aux organismes de maintenir le faible niveau d'oxygénation de l'ensemble de leurs tissus, indépendamment de l'augmentation des concentrations environnementales en oxygène (Massabuau, 2001). L'analyse de l'activité valvaire des mollusques bivalves permet d'accéder, dans une certaine mesure, à leur activité ventilatoire sans les perturber. Dès lors que les valves sont fermées, on doit considérer que l'activité ventilatoire est nulle, mais, *a contrario*, des valves ouvertes ne signifient pas obligatoirement une ventilation active. Accéder à cette activité valvaire est « relativement simple » et a été réalisé par de très nombreux expérimentateurs depuis le travail pionnier de Marceau (1909). Par contre, le faire pour de longues périodes, sans perturber le fonctionnement de base des organismes, dans leur milieu naturel ou en conditions de laboratoire, est plus complexe. Il s'agit de coller des électrodes sur leur exosquelette composé de deux valves dures. Avec le développement

de la Valvométrie HFNI, enregistrer l'activité valvaire en continu des mollusques bivalves c'est accéder à l'essentiel de leur comportement ainsi qu'à différents traits de vie tels que la croissance, la ponte, les rythmes biologiques ou encore la mort. Ainsi, il est possible de lire, dater et quantifier des modifications de l'activité valvaire puis de les corrélérer avec des changements de l'environnement, qu'ils soient liés à ses variations naturelles ou à des perturbations anthropiques (Andrade et al., 2016). Cela est d'autant plus pertinent que les mollusques bivalves sont des organismes qui s'avèrent capables de réagir à divers stress chimiques et sonores ou à différentes variables liées aux bouleversements climatiques actuels par exemple (Charifi et al., 2017, 2018 ; Garcia-March et al., 2016 ; Guo et Feng, 2018 ; Hartmann et al., 2016 ; Miller et Dowd, 2017).

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à deux espèces de mollusques bivalves, vivant dans des milieux contrastés. En eau douce, nous avons travaillé avec un bivalve fouisseur, la palourde asiatique *Corbicula fluminea*. En eau mer, nous avons travaillé avec l'huitre creuse du Pacifique *Magallana gigas*, de son « ancienne » appellation *Crassostrea gigas*, toujours valide et pouvant être préférée (Salvi et al., 2014 ; Salvi et Mariottini, 2017 ; Bayne et al., 2019).

### **3.2 Démarche expérimentale et dispositifs utilisés**

Au cours de ces travaux de thèse, des expérimentations ont été réalisées en conditions semi-naturelles et en conditions contrôlées de laboratoire. Les différentes procédures et conceptions expérimentales sont décrites ci-dessous.

Le même pétrole brut a été utilisé pour l'ensemble des expérimentations. Il s'agit d'un pétrole brut léger issu de Mer du Nord dont la couleur orangée était translucide. Sa densité était de 0,77 (à 15 °C) et sa viscosité dynamique était de 1,016 mPa·s (à 15 °C). La fraction résiduelle (28,2 % du pétrole brut) était composée de 84 % d'hydrocarbures saturés, de 15,5 % d'hydrocarbures aromatiques et de 0,5 % de composés polaires. En ce qui concerne la génération de la pollution sonore, un même passage de cargo préalablement enregistré dans

le port de Santander (Espagne) a été utilisé pour l'ensemble des expérimentations réalisées en conditions semi-naturelles et en conditions de laboratoire.

### **3.2.1 Expérimentation en conditions semi-naturelles**

Seuls quelques compléments et différents points clés ont été présentés dans cette partie. Les détails sont donnés dans les articles des § 5.2 et § 6.2.

Toute l'expérimentation en eau douce a été réalisée aux Rivières Pilotes de TOTAL à Lacq. Les corbicules *C. fluminea* ont été prélevés dans l'étang de Parentis - Biscarrosse (Landes, France), transportés à sec et au frais, puis conservées à la Station Marine d'Arcachon (Gironde, France) durant 10 jours dans des bacs (600 L) alimentés en eau douce en circuit ouvert. Un lot de 128 individus a été équipé d'électrodes HFNI pour l'étude de leur comportement. Durant cette période de stabulation, les corbicules étaient régulièrement nourris et étaient exposés à la photopériode naturelle. L'ensemble des corbicules a ensuite été transféré sur le site expérimental des Rivières Pilotes. Durant le transfert, les corbicules ont été maintenus hors d'eau, mais au frais et aucune mortalité n'a été détectée.

Les Rivières Pilotes sont un site unique en France qui permet la réalisation d'expérimentations en conditions semi-naturelles. Une présentation générale est proposée sur la Fig. 3.1. Le site se caractérise par une série de 16 cours d'eau artificiels parallèles (longueur, 40 m ; largeur, 0.5 m ; profondeur, 0.5 m) alimentés en circuit ouvert par l'eau douce du Gave de Pau qui est acheminée par gravité du barrage d'Artix. Nous avons travaillé dans 8 d'entre eux au cours de notre expérimentation. Les rivières sont exposées aux variations naturelles, l'eau n'est ni filtrée, ni traitée et une pépinière installée en amont constitue une réserve d'organismes vivants, favorisant une colonisation naturelle des mésocosmes (Bassères et al., 2004 ; Fig. 3.1). Le suivi continu des paramètres physico-chimiques (température de l'eau, concentration en oxygène dissous, pH, conductivité) est assuré par des sondes spécifiques positionnées à l'aval des cours d'eau (Bayona et al., 2014 ; Fig. 3.1). Pour les besoins spécifiques de notre expérimentation, une hauteur d'eau de 25 cm dans chaque rivière a été définie et des zones de sable (longueur, 1 m ; hauteur, 0.1 m) ont été créées pour permettre le positionnement et/ou l'enfouissement naturel des

corbicules. La vitesse de l'eau dans chaque canal a été réglée à  $3 \text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$ . Le temps de résidence dans chaque cours d'eau était environ 22 min.

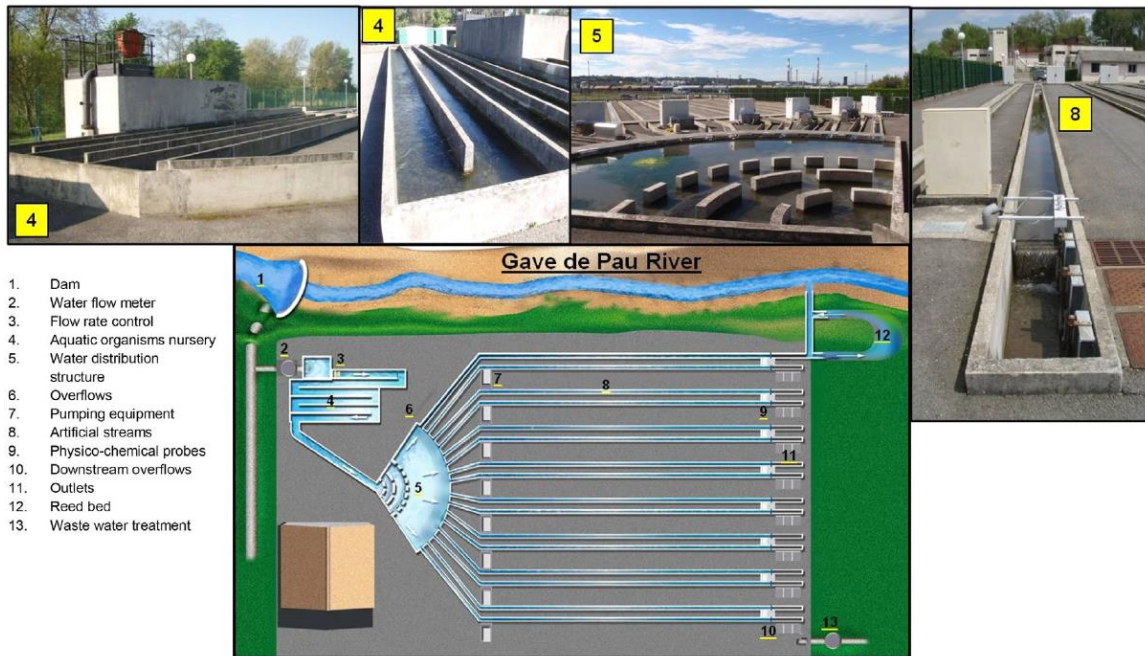


Figure 3.1. Présentation du site expérimental des Rivières Pilotes (TOTAL, Lacq, France). 1, Barrage ; 2, Débitmètre ; 3, Contrôle du débit ; 4, Pépinière d'organismes aquatiques ; 5, Ouvrage de distribution ; 6, Surverses amonts ; 7, Pompes d'injection ; 8, Ruisseaux artificiels ; 9, Sondes physico-chimiques ; 10, Surverses avals ; 11, Exutoires ; 12, Lit de roseaux ; 13, Traitement des eaux usées. D'après Cailleaud et al. (2019).

Les corbicules ont été placés en deux zones de chaque cours d'eau artificiel utilisé. Entre 19 et 20 m en aval de la zone d'injection (zone 'A' ; Fig. 3.2), 16 palourdes étaient équipées avec la Valvométrie HFNI et à une distance comprise entre 29 et 30 m (zone 'B' ; Fig. 3.2), une vingtaine de palourdes étaient réparties dans des cagettes pour les analyses tissulaires. L'espace des deux zones permet de ne pas perturber le comportement des animaux équipés (zone 'A'), dont le comportement est analysé en continu, pendant les prélèvements (zone 'B') réalisés à différents temps clés.

Huit conditions expérimentales ont été réalisées sur ce site, un contrôle et sept tests. Les perturbateurs ont été étudiés en conditions simples et multiples. Simples ; pétrole brut seul, baryum seul, pulses de turbidité seuls, pollution sonore sous-marine seule. Multiples ; Pétrole brut et baryum, pétrole brut et pulses de turbidité, pétrole brut et pollution sonore

sous-marine. Le pétrole brut et le baryum ont été continuellement injectés en tête de canal grâce à des pompes à piston et la dispersion du pétrole dans l'eau était assurée par une pompe à cisaillement qui permet la formation de microgouttelettes. Les concentrations nominales sont de  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour le pétrole brut et de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pour le baryum. Les pulses de turbidité de 3 h par jour (environ 250 – 300 NTU) ont été réalisés avec un mélange argile eau et injectés avec des pompes péristaltiques. Le bruit était généré grâce à des haut-parleurs sous-marins qui émettaient 4 à 7 fois par jour le passage d'un cargo préalablement enregistré dans un port de commerce (Charifi et al., 2018 ; Fig. 3.2). Les conditions d'exposition ont toutes été caractérisées au cours de cette expérimentation.

L'expérimentation s'est déroulée entre octobre 2016 et janvier 2017 et a été subdivisée en plusieurs périodes. La période 1 est une période d'acclimatation pour les corbicules. Elle a duré 16 jours. La période 2 est la période que nous avons utilisée pour établir le comportement de référence des corbicules. Elle a duré 10 jours. La période 3 est la période d'exposition. Cette période, d'une durée de 10 jours également, a débuté simultanément dans tous les cours d'eau. Enfin, la dernière période de 10 jours a été analysée comme une période de post-exposition.

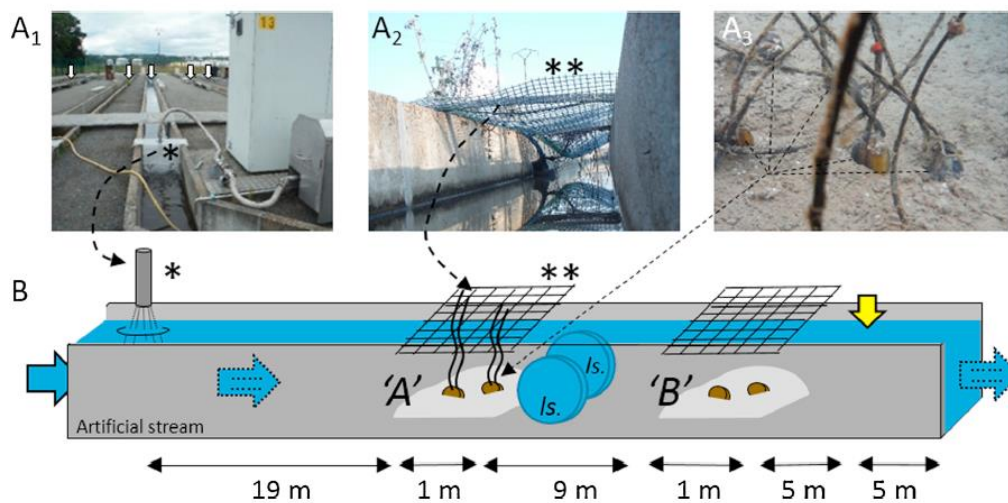


Figure 3.2. Présentation détaillée d'un cours d'eau équipé pour l'expérimentation. A1, les flèches blanches montrent 5 des 8 cours d'eau artificiels utilisés pour l'expérimentation et l'astérisque (\*) montre le point d'injection des différents perturbateurs (pétrole brut, baryum, turbidité). A2, deux astérisques (\*\*) montre le filet anti-oiseaux qui permet également de suspendre correctement les câbles des électrodes. A3, positionnement des corbicules équipés d'électrodes dans le sédiment. B, Schéma de principe montrant l'organisation des cours d'eau. De gauche à droite, arrivée de l'eau ; (\*) point d'injection du pétrole brut, du baryum ou de la turbidité ; 'A' et 'B', les deux zones de sable couvertes par des filets anti-oiseaux (\*\*) pour, en 'A', les corbicules équipés d'électrodes HFNI pour l'enregistrement du comportement et pour, en 'B', les corbicules destinés aux analyses tissulaires ; ls., les deux haut-parleurs sous-marins utilisés pour générer la pollution sonore sont positionnés en face à face et situés entre 0,1 et 2 m des corbicules au niveau des zones 'A' et 'B' ; la flèche jaune représente le point de prélèvement pour les analyses d'eau.

### 3.2.2 Expérimentations en conditions de laboratoire

Trois expérimentations de laboratoire ont été réalisées au cours de ces travaux. Toutes ont été réalisées à de la Station Marine d'Arcachon, en circuit ouvert d'eau de mer avec l'huitre comme modèle biologique.

L'expérimentation de laboratoire n° 1 fait l'objet du Chapitre 4. Elle visait à mieux caractériser les effets de la pollution sonore seule chez les bivalves. L'expérimentation de laboratoire n° 2 visait à mieux comprendre les effets du pétrole brut, en conditions mono et multistress, à des concentrations relativement faibles. Elle fait l'objet des § 5.3 et 6.3. L'expérimentation de laboratoire n° 3 visait à mieux comprendre les effets du pétrole brut à une concentration très forte. Elle fait l'objet du Chapitre 7.

De nombreux points concernant la démarche expérimentale et les dispositifs utilisés sont communs à l'ensemble de ces expérimentations. Ils sont présentés ci-dessous.

Pour ces expérimentations en eau de mer, des huitres de l'espèce *M. gigas* ont été utilisées. Ces huitres nous ont été fournies par des ostréiculteurs locaux et ont été prélevées au niveau du Banc d'Arguin. Ce sont des huitres de calibre n° 4, dont le poids standardisé est compris entre 46 et 65 g. Avant chacune des expérimentations, les huitres ont été maintenues en stabulation durant 1 à 3 semaines dans des bacs de 600 L alimentés par un circuit ouvert d'eau de mer naturelle. En plus de la nourriture se trouvant naturellement dans l'eau, elles ont été régulièrement supplémentées durant cette période par des cultures d'algues et ont été exposées à la photopériode naturelle. Certaines d'entre elles ont par suite été prélevées et équipées d'électrodes pour permettre l'analyse de leur comportement. Afin de pallier la perturbation induite chez ces animaux par la pose des électrodes sur leur coquille et la manipulation, les huitres sont disposées dans les dispositifs expérimentaux pour une période de « récupération » et d'acclimatation au minimum 1 semaine avant le début des expérimentations.

Les 3 expérimentations de laboratoire ont été réalisées dans la même salle expérimentale de la Station Marine d'Arcachon. Les fenêtres ont été obstruées afin de rendre la salle hermétique à la lumière extérieure. La température de l'air a été maintenue constante grâce



un système de climatisation et le renouvellement de l'air a été assuré par une ventilation mécanique contrôlée (VMC). De nombreuses précautions sont prises dans cette salle afin de ne pas perturber les comportements naturels des animaux (voix basse, pas de mouvements brusques, pas légers, salle non libre d'accès et « va et vient » limité).

Les huitres sont placées dans des unités expérimentales (UE) en verre pour les expositions avec le pétrole brut et dans des UE en plastique pour les expositions avec le cadmium (étude préliminaire sur l'impact de la pollution sonore ; Chapitre 4). Ces UE ont toutes été disposées sur des tables antivibrations de fabrication « maison ». Ces systèmes antivibratoires se caractérisent par l'alternance de plusieurs « couches » construites avec des matériaux différents. L'idée est qu'à chaque transition de couche dans des matériaux de différentes densités, les vibrations venant du sol perdent de l'énergie. Le but final est d'arriver à éliminer les vibrations parasites liées à l'activité du laboratoire pour être proche des conditions de terrain (Massabuau et Forgue, 1996). La Fig. 3.3 illustre ce dispositif.

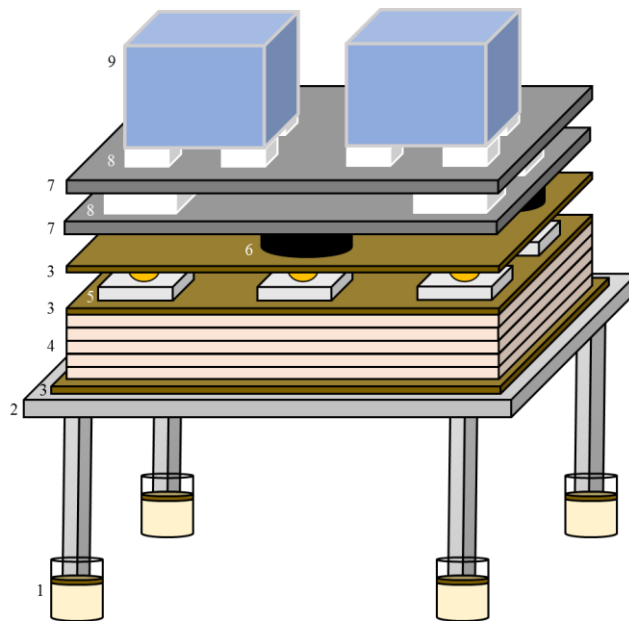


Figure 3.3. Exemple de tables antivibrations déployées pour les expérimentations en conditions de laboratoire. 1, Sable et bois ; 2, Table en métal ; 3, Bois ; 4, Isolant ; 5, Bois et balle de tennis ; 6, Chambre à air ; 7, Plaques de béton ; 8, Polystyrène ; 9, Unité expérimentale.

Les UE étaient alimentées en continu en eau mer avec un débit contrôlé et régulièrement vérifié. Dans chaque UE, les entrées et sorties d'eau étaient toujours positionnées les plus

éloignées possible l'une de l'autre. Les UE étaient artificiellement éclairées par des néons spécifiques (un néon bleu et un néon lumière du jour) positionnés au-dessus. Toutes les UE recevaient une quantité équivalente de lumière. Les paramètres physicochimiques de l'eau (température, pH et salinité) ont été contrôlés. Les UE en verre translucide ont été entourées d'un film noir et les UE en plastique ont été choisies en plastique coloré, non translucide. Durant l'ensemble des expérimentations, les huitres ont été nourries chaque jour et à heure fixe avec une quantité précise d'algues déshydratées. Elles ont été exposées à une photopériode spécifique choisie en fonction des valeurs environnementales du moment où les expérimentations ont été réalisées. Au cours d'une même expérimentation, le même nombre d'huitres, équipées ou non, a toujours été disposé dans chacune des UE.

Dans l'ensemble des expérimentations, des huitres ont été prélevées et disséquées à différents temps clés pour des analyses géniques, des analyses de protéomique ou de contamination. Le plus souvent, les huitres ont été prélevées à l'aide de pinces afin de ne pas perturber le comportement des autres individus présents dans l'UE. Des prélèvements d'eau ont également été réalisés chaque jour afin de vérifier les concentrations des différents contaminants *a posteriori*. Des mesures de bruit généré par les haut-parleurs sous-marins et d'hypoxie ont également été réalisées au cours des expérimentations.

Au cours de l'expérimentation de laboratoire n° 1, qui fait l'objet du Chapitre 4, les huitres ont été exposées au Cd seul ou au Cd plus pollution sonore. Pour ce faire, des huitres équipées ou non d'électrodes ont été disposées dans 4 UE distincts (Fig. 3.4). Les huitres équipées d'électrodes étaient destinées à l'analyse du comportement. Les huitres non équipées d'électrodes étaient destinées aux analyses géniques ainsi qu'aux analyses de bioaccumulation du Cd. Les huitres de 2 des 4 UE, qui constituent 2 réplicas biologiques, ont été exposées uniquement au Cd tandis que les huitres des 2 autres UE ont été exposées au Cd et à la pollution sonore. L'apport de Cd dans les 4 UE a été réalisé de façon continue par une pompe péristaltique. Un ajout unique d'une solution de Cd a été réalisé au moment du lancement de la contamination afin d'atteindre immédiatement la concentration souhaitée dans les UE ( $\approx 14 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). L'homogénéisation a été réalisée à l'aide de bulleurs d'aquariums placés dans des air-lifts couverts (Fig 3.4, A). Dans 2 des 4 UE, des haut-parleurs sous-marins étaient présents. Ils étaient suspendus avec des absorbeurs de vibrations au-dessus des UE et à demi immergés (Fig 3.4, B). Ils ont émis (*via* une interface

informatique et un amplificateur) le bruit de 92 passages de cargo par jour avec une puissance maximale de  $150 \pm 5$  ou  $138 \pm 5$  dB re  $1 \mu\text{Pa}$ , aléatoirement répartis sur une playlist de 72 h. L'expérimentation a été scindée en 3 périodes. La première période est la période d'acclimatation des huitres, elle a duré 6 jours. Durant la seconde période, les huitres de 2 des 4 UE ont été exposées à la pollution sonore pendant 5 jours. Durant la troisième période les huitres des 4 UE ont été exposées au Cd durant 14 jours.

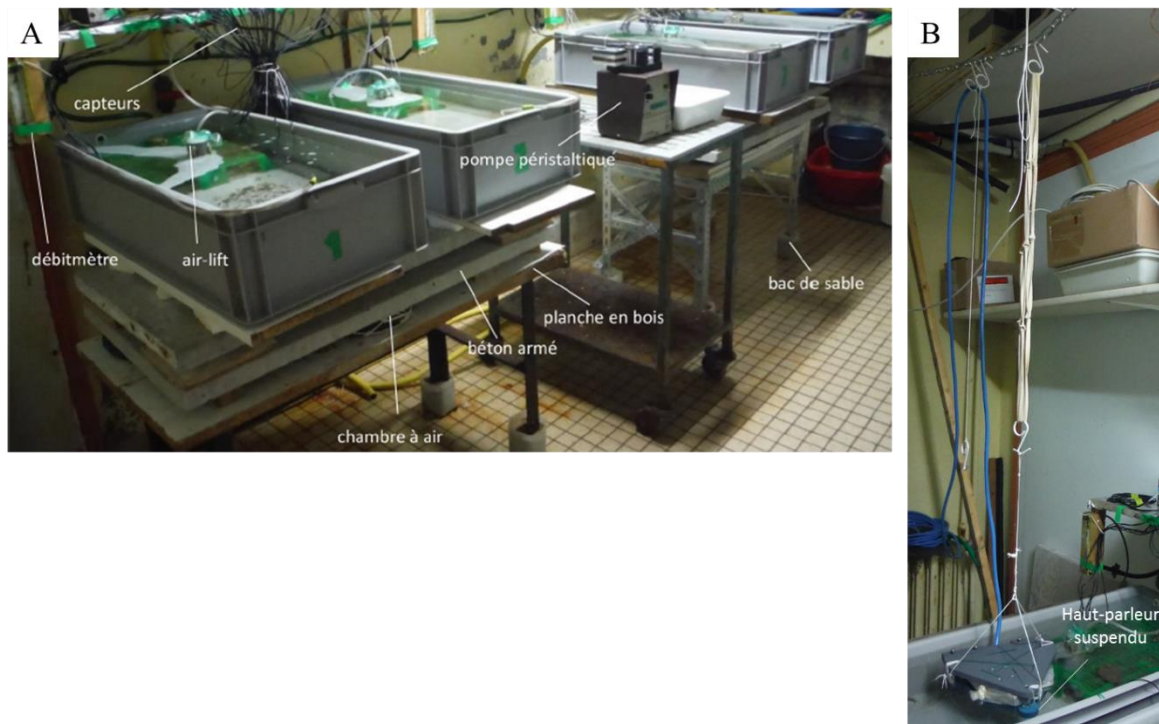


Figure 3.4. A, Dispositif expérimental déployé lors de l'exposition des huitres au Cd et à la pollution sonore. B, Vue centrée sur un haut-parleur suspendu et à demi immergé dans une UE et son mode de suspension dans la colonne d'eau.

Au cours de l'expérimentation de laboratoire n° 2, les huitres ont été exposées au pétrole brut seul à des concentrations nominales comprises entre  $390$  et  $2800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , au pétrole brut plus pollution sonore (suivant la même configuration et le même protocole que lors de l'expérimentation n° 1 décrite précédemment) et au pétrole brut plus hypoxie (pression partielle d'oxygène,  $\text{PO}_2 = 2\text{-}3 \text{ kPa}$  ; pour rappel,  $\text{PO}_2$  dans une eau équilibrée à l'air =  $21 \text{ kPa}$ ). Le dispositif est présenté sur la Figure 3.5. Huit EU ont été déployées pour réaliser les 4 conditions expérimentales en parallèle et en réplicas (deux UE par condition

expérimentale : contrôle, pétrole brut seul, pétrole brut + pollution sonore, pétrole brut + hypoxie ; Fig. 3.5 E). Chacune de ces UE contenait 16 huitres équipées d'électrodes (Fig. 3.5 D). Leur comportement a été enregistré tout au long de l'expérimentation. À la fin de l'expérience, ces huitres ont été disséquées pour des analyses de protéomique et des dosages de HAP.

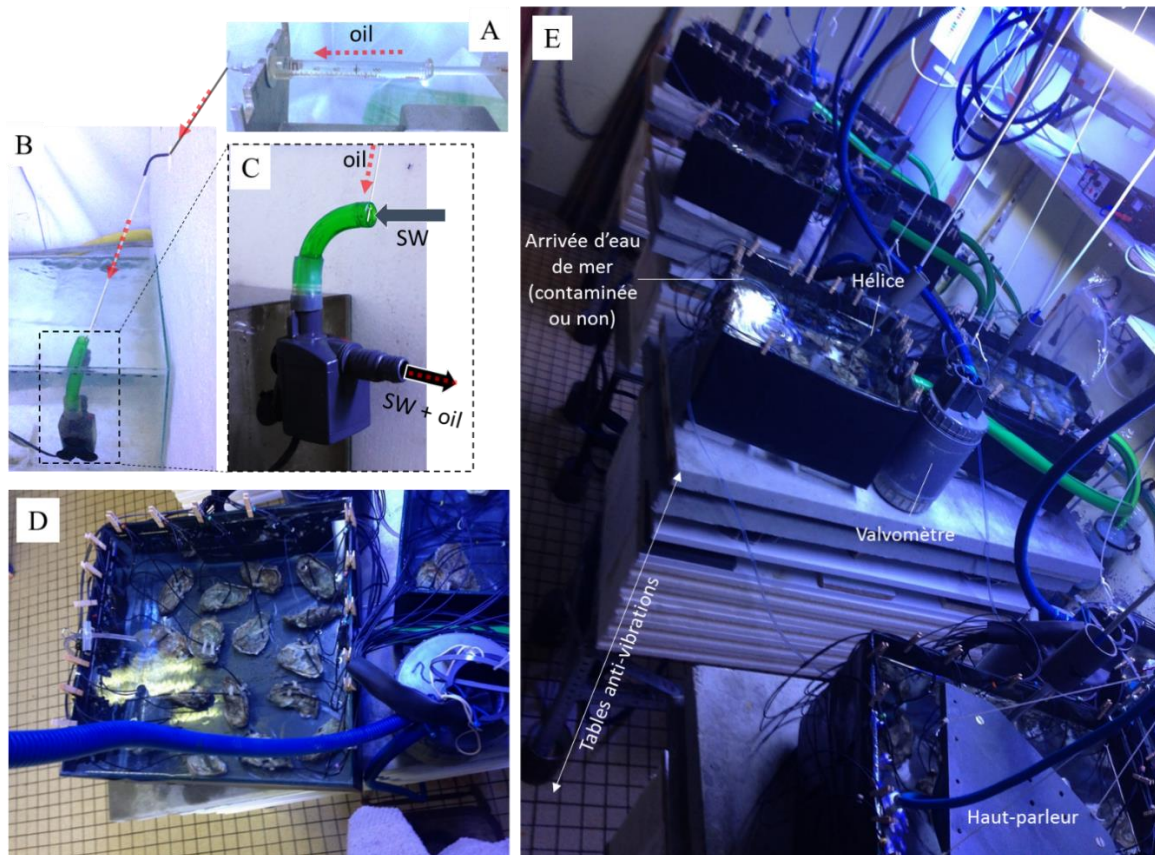


Figure 3.5. A, B, C, Photos du dispositif expérimental déployé pour l'injection de pétrole brut ; oil, pétrole brut ; SW, eau de mer ; les flèches rouges en pointillé symbolisent le trajet du pétrole brut. D, Photo de la disposition des huitres dans une UE et arrangements des câbles des électrodes avec de petites pinces en bois. E, Vue générale du dispositif expérimental mis en place.

Un ajout unique de pétrole brut (préalablement homogénéisé avec de l'eau de mer grâce à un agitateur magnétique) a été réalisé dans chacune des UE et dans la nourrice au moment du lancement de la contamination puis l'injection de pétrole a été réalisée en continu à l'aide d'un pousse seringue (Fig. 3.5, A). À partir du pousse seringue, le pétrole a été injecté dans la tête d'une pompe de brassage ( $1000 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Le pétrole était ainsi directement brassé avec

l'eau de mer contenue dans la nourrice (Fig. 3.5, B, C). Le mélange eau de mer + pétrole était ensuite envoyé dans les différentes UE *via* des pompes péristaltiques. Tous les débits ont été mesurés et contrôlés une fois par jour : celui du pousse seringue, celui d'arrivée d'eau de mer dans la nourrice et ceux amenant le pétrole brut mélangé à l'eau de mer dans chacune des UE. Notons ici la présence d'une nourrice en parallèle, où l'eau de mer était également brassée en continu, mais sans ajout de pétrole, pour les UE contrôles. Dans chaque UE, une hélice de modélisme a fonctionné en continu (avec un moteur 6 V) et a permis leur homogénéisation permanente (Fig. 3.5, E). Durant toute l'expérimentation, les UE et nourrices ont été recouvertes avec un plastique fin et transparent pour limiter la brumisation. La pollution sonore a été réalisée avec la même installation que celle déployée lors de l'expérimentation de laboratoire n° 1 (Fig. 3.4, B et Fig. 3.5, E) et suivant le même protocole d'exposition (92 passages de cargo par jour aléatoirement répartis sur une playlist de 72 h répétée en boucle). L'hypoxie a été réalisée avec le mélange ternaire O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> avec une pression partielle d'oxygène (PO<sub>2</sub>) de 2-3 kPa. Ce mélange a été envoyé dans les EU grâce à un bulleur d'aquarium. Il a été contrôlé grâce à un ensemble de régulateurs de débit massique et calibré avec un analyseur paramagnétique d'O<sub>2</sub> (Servomex). L'expérimentation a été scindée en 3 périodes. La période d'acclimatation a duré 9 jours. Les huitres ont ensuite été exposées à la pollution sonore uniquement (dans 2 des 8 UE) ou à l'hypoxie uniquement (dans 2 autres des 8 UE) durant une période de 5 jours. Puis la contamination par le pétrole brut a été initiée et maintenue pendant 8 jours. Dans 2 des 8 UE, les huitres ont donc été exposées au pétrole brut seul. Dans 2 autres UE, les huitres ont été exposées au pétrole brut et à la pollution sonore ou au pétrole brut et à l'hypoxie.

Comme nous ne pouvions pas doser quotidiennement les concentrations réelles de pétrole brut, chaque jour les comportements des huitres ont été évalués sur la base des connaissances que nous avons chez les corbicules, et la concentration de pétrole brut injectée a été modifiée en conséquence. La contrainte n° 1 dans ce type d'expérimentation étant l'absence de stress parasite (*i.e.* l'interdiction de toucher les animaux ou encore l'obligation d'intervention *a minima* sur les UE), nous n'avons pas pré-équilibré les tuyauteries et les parois des UE pour saturer les sites d'adsorption. Nous avons donc choisi de « subir » et d'accepter un temps de saturation du système expérimental. L'alternative a alors été de réaliser discrètement des prélèvements d'eau dans chaque UE pour connaître *a posteriori* la contamination effectivement réalisée.

L'expérimentation de laboratoire n° 3 a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que l'expérimentation n° 2 décrite précédemment, la différence essentielle résidant dans les concentrations de pétrole brut injectées. Au cours de cette expérimentation, le pétrole brut a été injecté dans la nourrice, pour être brassé avec l'eau de mer, avec une pompe péristaltique à la place d'un pousse seringue. Au moment du lancement de la contamination par le pétrole, un ajout unique a été réalisé dans la nourrice uniquement. Après deux jours d'exposition à une concentration qui a pu atteindre jusqu'à une valeur nominale de  $\approx 400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , les huitres encore vivantes ( $n = 2$  à 4 huitres en fonction des UE sur 8) ont été prélevées et disséquées.

### **3.3 L'analyse du comportement**

#### **3.3.1 La Valvométrie HFNI**

L'utilisation d'outils adaptés, efficaces et fiables est fondamentale pour mesurer et contrôler l'impact environnemental des activités anthropiques, particulièrement dans des environnements extrêmes ou lointains, mais aussi au laboratoire (Massabuau et al., 2015). La Valvométrie HFNI (Haute Fréquence Non Invasive) avec ses nombreux développements est un outil novateur pour le biomonitoring des écosystèmes aquatiques. Elle permet une étude fine du comportement par la numérisation du signal et la mise en évidence de différents traits de vie qui incluent croissance, ponte, rythmes biologiques et mort en temps quasi réel (Andrade et al. 2016). Elle permet d'obtenir une forte sensibilité grâce à des contraintes expérimentales minimales ou absentes pour les bivalves et permet donc le respect de leur comportement naturel (Tran et al., 2003). Elle permet d'obtenir une haute fréquence d'échantillonnage de l'activité valvaire dans un groupe de 16 animaux (Sow et al., 2011), elle fonctionne en autonomie, ne requiert aucun besoin de maintenance régulier (pas de problème lié au fouling) et ne consomme que peu d'énergie (0.5-1 watt). N'étant soumise à aucune limite géographique, cette technologie est opérationnelle dans différents contextes naturels (marin, dulçaquicole, estuarien, lacustre) et industriels (Andrade et al.,

2016 ; Blanc et al., 2017) partout où Internet est présent et/ou la téléphonie mobile fonctionne.

Afin d'analyser l'activité valvaire des animaux, 2 électro-aimants de faible poids (poids nu, 54 mg ; poids enrobé de résine protectrice,  $\leq 1$  g) sont positionnés en vis-à-vis sur la face externe des valves (Fig. 3.6). Les mesures de variation de voltage produites par le courant électromagnétique entre les deux électro-aimants sont régies par la loi de Maxwell :

$$\varepsilon = -N \cdot \frac{\delta\Phi_B}{\delta t}$$

Avec  $\varepsilon$  la force électromagnétique (volts),  $N$  le nombre de tours de l'électro-aimant,  $\Phi_B$  le flux magnétique (webers) et  $t$  le temps.

Les électro-aimants sont ensuite reliés par des câbles souples à une carte d'acquisition analogique de rang 1 placée dans un boîtier étanche pouvant être immergé à côté des bivalves. Au cours de nos expérimentations, les boîtiers n'ont pas été immergés. La fréquence d'acquisition des données (heure-min-sec, numéro du bivalve, voltage) dans le groupe de 16 bivalves est de 10 Hz, soit toutes les 1,6 sec par individu. Une carte de rang 2 émergée, reliée à la carte de rang 1 par l'intermédiaire d'un câble ombilical, permet la gestion des connectivités ainsi que le transfert quotidien des données par le réseau de téléphonie mobile ou Internet. Les données sont réceptionnées chaque jour sur un processeur (Dell biprocesseur 8 cœurs) basé à la Station Marine d'Arcachon. Les données reçues (c'est-à-dire 2 592 000 valeurs par valvomètre et par groupe de 16 bivalves) sont ensuite traitées quotidiennement par différents algorithmes mathématiques décrits par Sow et al. (2011). Les résultats peuvent ensuite être publiés sur des pages professionnelles ou publiques du site Internet MolluSCAN eye (Fig. 3.7). Les principales analyses qui ont été utilisées dans ce travail sont présentées dans la partie suivante (§ 3.3.2).

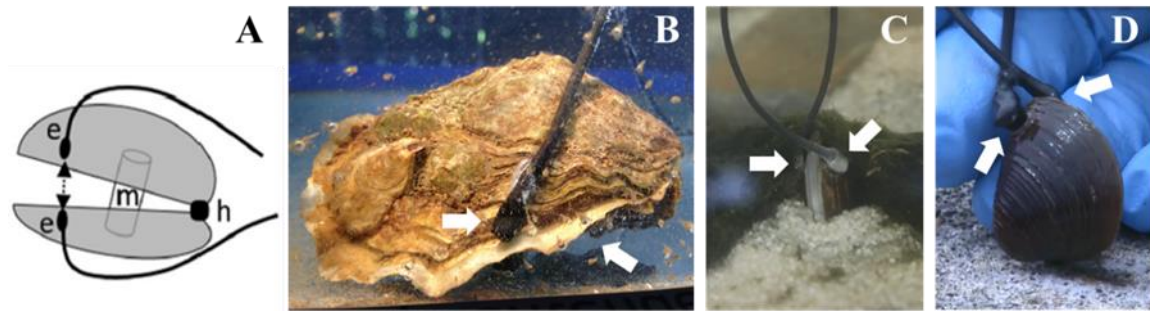


Figure 3.6. Electrodes HFNI. (A) Représentation schématique du positionnement des électrodes HFNI (e) collées en vis-à-vis sur chacune des valves du bivalve, avec le positionnement schématique du muscle (m) et de la charnière (h). Photos d'une huître équipée avec les électrodes HFNI (B) et de palourdes positionnées dans le sédiment (C) ou non (D). Les flèches blanches indiquent la position des électrodes.

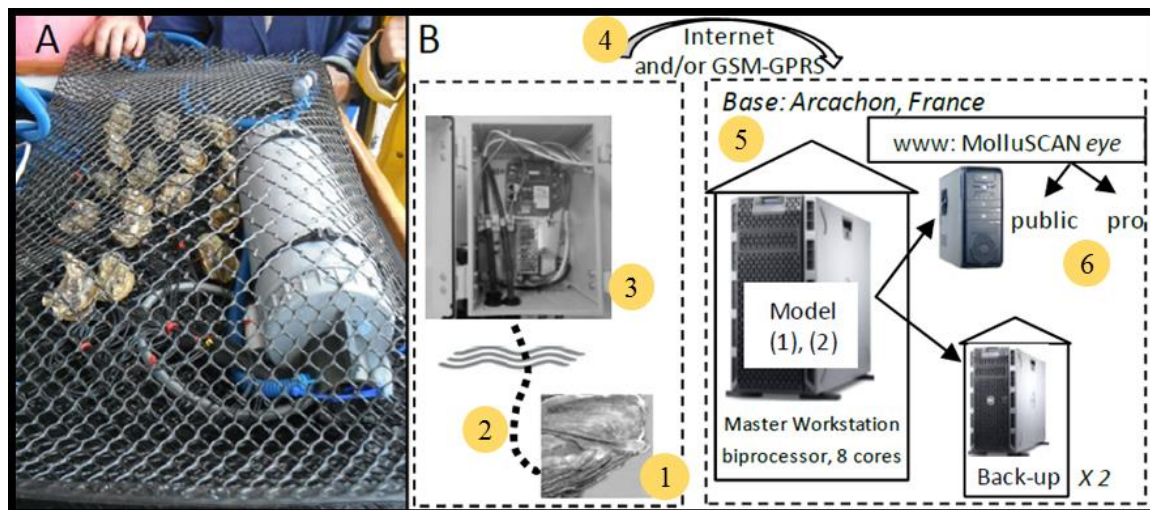


Figure 3.7. Illustration de la chaîne d'acquisition de l'activité valvaire des mollusques bivalves sur le terrain. (A) Les bivalves sont équipés avec les électrodes HFNI, elles-mêmes reliées au boîtier étanche contenant la carte électronique de rang 1 (tube gris). (B) Schéma de principe du terrain au laboratoire avec en (1) les bivalves équipés reliés au boîtier étanche immergé, en (2), la connexion électrique au travers d'un câble ombilical jusqu'au boîtier émergé contenant la carte électronique de rang 2 en (3), en (4) la transmission des données, en (5) la réception des données à la station Marine d'Arcachon, en (6) le traitement et la publication quotidienne des données, avec en parallèle plusieurs sauvegardes physiques externes sur 2 sites géographiques séparés.



### 3.3.2 Les principaux paramètres comportementaux étudiés

**L'amplitude d'écartement des valves.** A chaque valeur d'écartement valvaire est associée une amplitude d'ouverture, exprimée en pourcentage. Les valeurs d'amplitude 0 et 100 % sont définies à partir des valeurs minimale et maximale d'écartement des valves relevées pour chaque individu sur les 6 jours glissants précédant la mesure. Elles sont considérées comme les valeurs ouvert – fermé de référence de l'animal. L'amplitude est ensuite déterminée à l'échelle du groupe étudié, en faisant la moyenne des valeurs individuelles : c'est le pourcentage d'amplitude d'ouverture horaire moyen du groupe (VOA).

**La durée de fermeture des valves.** Le pourcentage de fermeture horaire est basé sur la mesure du temps que chaque animal passe fermé chaque heure (en fait à un pourcentage d'ouverture inférieur à 5 % de la capacité maximale d'ouverture mesurée sur les 6 jours glissants précédant la mesure). Si le bivalve est continuellement fermé pendant une heure, le pourcentage de la durée de fermeture horaire est de 100 %. Si, à l'inverse, il est ouvert pendant une heure, le pourcentage de la durée de fermeture horaire est de 0 %. Toutes les valeurs intermédiaires sont possibles. Le paramètre est ensuite déterminé à l'échelle du groupe étudié, en faisant la moyenne des valeurs individuelles : c'est le pourcentage de fermeture horaire moyen du groupe (VCD).

**L'agitation des valves.** L'agitation des valves est mesurée par le calcul de la distance parcourue par les électrodes par unité de temps. La distance qu'elles parcourent est calculée (en valeur absolue et en mm) par la valeur de l'écartement valvaire à  $t_n$  soustraite à la valeur précédente ( $t_{n-1}$ ). Une somme est réalisée chaque heure pour chaque animal. Ce paramètre est ensuite déterminé à l'échelle du groupe étudié, en faisant la moyenne des valeurs individuelles chaque heure : c'est l'agitation horaire moyenne du groupe (VA). Afin de pondérer ce paramètre, il peut être divisé par VOA, l'amplitude d'ouverture horaire moyenne du groupe et multiplié par 100 : c'est l'indice d'agitation des valves (VAI), qui donne une estimation relative de l'agitation des valves pendant les phases d'ouverture.

**Le temps de réaction des bivalves.** La première réaction de fermeture des valves, le début d'une brève série d'ouvertures et de fermetures des valves suivie par leur fermeture continue ou encore le début d'une forte agitation peuvent être considérés comme la première réaction

comportementale face aux différents stimulus appliqués. Un pourcentage de réponse, basé sur l'utilisation de variables binaires, a pu être établi pour le groupe de bivalves, et ce, à différents temps d'intégration suivant l'initiation des expositions aux différents agents stressants (Tran et al., 2003).

### **3.4 L'analyse des perturbations du milieu intérieur**

#### **3.4.1 Les tissus ciblés**

**Chez la palourde d'eau douce *C. fluminea***, nous nous sommes concentrés sur deux tissus - le pool muscles plus ganglions nerveux d'une part et les branchies d'autre part - pour leurs rôles d'intérêt dans l'établissement du comportement face à la contamination chimique (Fig. 3.8). Le pool était composé des muscles adducteurs antérieurs et postérieurs (qui sont chacun un mélange de muscles striés et lisses), des muscles rétracteurs pédieux antérieurs et postérieurs, des ganglions cérébraux appariés, des ganglions viscéraux appariés et de leurs innervations vers les muscles (Britton et Morton 1982 ; Kraemer et Lott, 1977). Chez *C. fluminea*, les ganglions cérébraux et les ganglions viscéraux sont deux des trois principaux ganglions du système nerveux. Les ganglions cérébraux reposent à plat contre les muscles pédieux antérieurs tandis que les ganglions viscéraux se nichent dans les muscles pédieux postérieurs. Ils sont donc prélevés quand on prélève les muscles correspondants. Les ganglions viscéraux innervent les branchies par un nerf branchial, les muscles adducteurs et pédieux. Les ganglions cérébraux sont reliés au système digestif (œsophage, estomac, intestin, etc.) et aux ganglions pédieux. Les ganglions viscéraux et cérébraux sont également reliés entre eux. Chez les bivalves, les muscles adducteurs et le ligament élastique situé le long de la charnière sont les effecteurs mécaniques du mouvement des valves. Lorsque ces muscles sont touchés, on s'attend à ce que l'activité des valves soit modifiée et *vice versa*. Le muscle rapide (ou muscle strié) est responsable des contractions rapides alors que le muscle lent (ou muscle lisse) est responsable de l'état de « catch », c'est-à-dire du maintien de la fermeture des valves pendant de longues périodes avec une demande d'énergie minimale (Sun et al., 2018). Les branchies ont été échantillonnées parce qu'elles sont, avec le siphon inhalant et le bord du manteau, sur la ligne de front durant toute contamination.

Le tissu branchial, particulièrement complexe, est composé de tissus où s'effectue la majorité des échanges respiratoires, de tissus d'échange ionique, de tissus immunitaires, de pompes ciliaires et musculaires pour les mouvements de l'eau et l'alimentation (Britton et Morton, 1982 ; Gainey et al., 2003 ; Medler et Silverman, 2001 ; Mommsen, 1984). Les branchies sont richement innervées par un nerf branchial provenant des ganglions viscéraux (Britton et Morton, 1982 ; Kraemer et Lott, 1977).

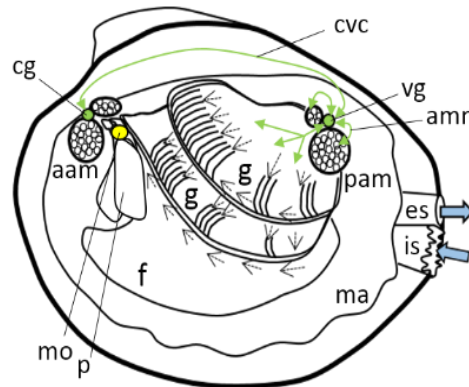


Figure 3.8. Diagramme schématisique représentant les tissus ciblés dans ce travail et différentes informations de base sur l'anatomie de *C. fluminea*. aam, muscle adducteur antérieur ; cg, ganglion cérébral ; cvc, connectif cérébro-viscéral ; es, siphon exhalant ; f, pied ; g, branchies ; is, siphon inhalant ; ma, manteau ; mo, bouche ; p, palpes labiaux ; pam, muscle adducteur postérieur ; vg, ganglion viscéral. Les flèches vertes représentent les nerfs efférents du ganglion viscéral vers les muscles adducteurs, vers les branchies et entre les ganglions viscéraux et cérébraux. Les flèches bleues représentent les mouvements d'eau et les flèches noires les mouvements du mucus branchial à la surface des branchies.

**Chez l'huître *M. gigas*,** nous nous sommes concentrés sur quatre tissus cibles : le muscle lisse, le muscle strié et le ganglion nerveux viscéral qui ont pu être facilement isolés les uns des autres lors des dissections ainsi que les branchies. Ces tissus ont été choisis pour leurs rôles d'intérêt dans l'établissement du comportement et face à la contamination chimique sur les mêmes bases que pour *C. fluminea*. Chez *M. gigas*, il est possible de dissocier spécifiquement la fraction nerveuse (i.e. le ganglion viscéral) du pool musculaire lors des dissections. Chez l'huître *M. gigas*, le système nerveux apparaît relativement simple car il présente un phénomène de fusion. Il est composé uniquement de deux paires de ganglions nerveux communiquant et d'un large réseau de nerfs (Galtsoff, 1964 ; Fig. 3.9). Le ganglion viscéral, la plus grande unité du système nerveux de l'huître, est une structure en forme de

cacahuète enchâssée sur le versant antéroventral du muscle adducteur au sein de la dépression formée par la jonction du muscle lisse et du muscle strié. Les parties droites et gauches du ganglion viscéral sont fusionnées en un seul organe dont plusieurs paires de nerfs émergent des deux sections latérales. Ces nerfs innervent le manteau, les branchies, les muscles adducteurs, les reins, le péricarde, le système digestif jusqu'au rectum, la gonade, l'organe palléal (Bullock et Horridge, 1965 ; Galtsoff, 1964). Au contraire, les ganglions cérébraux de l'huitre sont faiblement développés, relativement petits, constitués seulement de très petites cellules nerveuses et de quelques fines fibres nerveuses. Ils sont connectés entre eux par la commissure cérébrale et localisés à la base des palpes labiaux qu'ils innervent. Ils innervent également le manteau. Le système nerveux de l'huitre a été considéré par Galtsoff (1964) comme décentralisé du fait de la présence de ces deux centres nerveux (i.e. les ganglions cérébraux et viscéraux). Néanmoins, le ganglion viscéral, très développé chez l'huitre, est considéré comme l'élément central et majeur de son système nerveux. Sugawara (1964) le décrit comme étant le cerveau de l'huitre et l'assimile au système nerveux central des vertébrés (Sugawara, 1964).

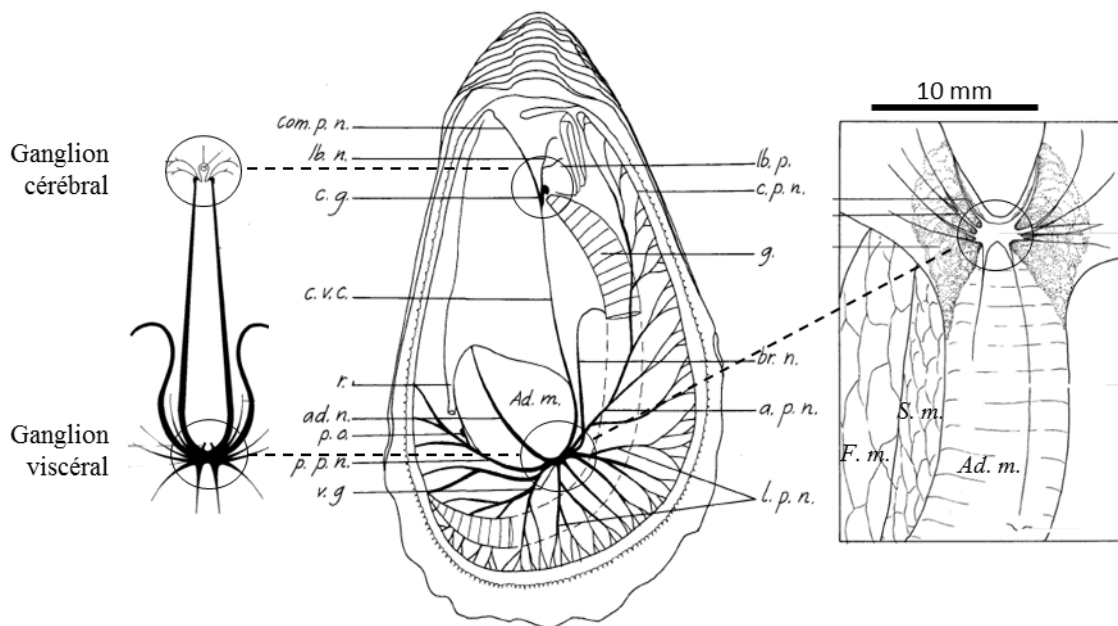


Figure 3.9. Organisation détaillée du système nerveux de l'huitre (d'après Galtsoff, 1964). Ad.m, muscles adducteurs ; ad.n, nerfs du muscle adducteur ; a.p.n, nerf palléal antérieur ; br.n., nerf branchial ; e.g., ganglion cérébral ; c.p.n., nerf circumpalléal ; com.p.n., nerf palléal commun ; c.v.c., connectif cérébro-viscéral ; g., gills ; lb.n., nerf labial ; lb.p., palpes labiaux ; l.p.n., nerf palléal latéral ; p.o., organe palléal ; p.p.n., nerf palléal postérieur ; r., rectum ; v.g., ganglion viscéral ; F. m., muscle rapide ; S. m., muscle lent.

La Figure 3.10 présente l'anatomie comparée du système nerveux chez divers mollusques bivalves. On voit que l'huitre *M. gigas* est un cas particulier avec une fusion de ganglions vers le ganglion viscéral et donc un regroupement probable de fonctions dans ce ganglion. Nous avons utilisé cette particularité anatomique dans notre analyse de l'impact du pétrole brut en travaillant spécifiquement sur cet organe, ce qui était impossible chez *C. fluminea*. Chez le corbicule le ganglion viscéral aurait pu être disséqué, mais à la fois le temps de dissection et la masse de tissu pouvant être prélevée et analysée aboutissaient à une impasse expérimentale.

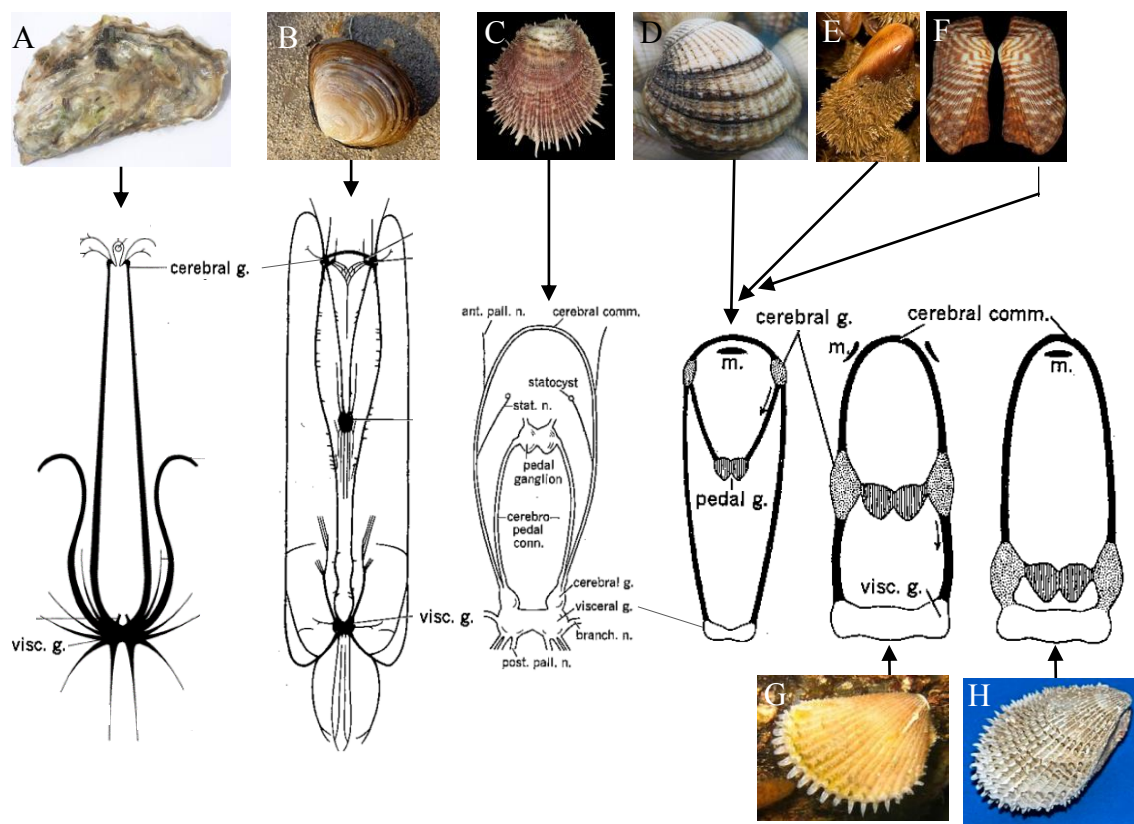


Figure 3.10. Anatomie comparée du système nerveux chez les mollusques bivalves. Le plus haut degré d'intégration est observé chez *M. gigas* (A) avec l'intégration de tous les ganglions dans le ganglion viscéral à l'exception du ganglion cérébral qui devient minuscule. Le plus faible niveau d'intégration est chez *Spharium*. Système nerveux central, (A) *C. gigas*, (B) *Spharium* sp., (C) *Spondylus multisetosus*, (D) *Cardium* sp., (E) *Modiolus* sp., (F) *Arca* sp., (G) *Lima inflata*, (H) *Lima squamosa* (Bullock et Horridge, 1965 ; Galstoff, 1964 ; Willigen, 1920).

### 3.4.2 L'analyse du protéome

Dans le présent travail, une analyse de protéomique différentielle (entre animaux contrôles non exposés et animaux exposés au pétrole seul) a été réalisée afin d'accéder aux perturbations du milieu interne des bivalves de manière globale et sans *a priori*. Cette analyse a été faite d'une part dans les branchies et le pool muscles + ganglions des corbicules exposés au pétrole brut en conditions semi-naturelles et d'autre part, dans le ganglion viscéral des huitres exposées au pétrole brut en conditions contrôlées de laboratoire. Ces analyses ont été réalisées en collaboration avec le Centre de Génomique Fonctionnelle de l'Université de Bordeaux (CGFB) au sein de leur plateforme Protéome (CGFB Protéome).

L'analyse du protéome est considérée comme un outil puissant dans la recherche en écotoxicologie (Campos et al., 2012 ; Lemos et al., 2009 ; Van Aggelen et al., 2010). Le protéome peut se définir comme l'ensemble des protéines que l'on considère être exprimé par un organisme (UniProt, « Universal Protein Resource »). Les protéines sont le résultat de l'expression des gènes. Ce sont des molécules complexes caractérisées par leur séquence spécifique d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques, par leur conformation en 3 dimensions (ou repliement) qui définit différents niveaux structuraux et leur stabilité ainsi que par d'éventuelles modifications post-traductionnelles. Elles remplissent une multitude de fonctions au sein des organismes. Elles peuvent être des enzymes, des histones, des hormones, des anticorps, jouer un rôle structurel, dans le transport, dans la régulation, dans la signalisation, dans la perception, dans la défense, dans le stockage, et sont ainsi impliquées à différentes échelles biologiques (biochimique, cellulaire, tissulaire).

L'approche utilisée ici est l'approche dite « bottom-up » (du bas vers le haut). Les principales étapes de cette approche sont l'extraction et la purification des protéines, l'hydrolyse enzymatique des protéines en peptides spécifiques, la séparation des peptides par chromatographie liquide, l'analyse des peptides et fragments avec la spectrométrie de masse en tandem (Zhang et al., 2013). L'identification se base sur la comparaison des données obtenues à celles qui se trouvent dans des banques de données grâce à un ou plusieurs algorithmes de recherche. Pour la quantification relative, la stratégie sans marquage (« label free ») dans laquelle les échantillons sont analysés séparément, mais successivement a été utilisée.

Les grandes étapes de ces analyses et leurs principes sont présentés ci-dessous.

**Dissections et conditionnement des échantillons.** L'ensemble des dissections a été réalisé dans un laps de temps le plus court possible techniquement, quelques minutes tout au plus, à l'issue du prélèvement des organismes placés sur de la glace. Les échantillons biologiques (i.e. l'ensemble du tissu branchial et l'ensemble des muscles adducteurs antérieurs et postérieurs - muscles rétracteurs pédieux antérieurs et postérieurs - ganglions cérébraux - ganglions viscéraux - innervations vers les muscles chez les corbicules et le ganglion viscéral chez des huitres) ont été conditionnés individuellement dans des tubes spécifiques. Sur le site des Rivières Pilotes à Lacq, les prélèvements réalisés sur les corbicules ont été mis directement à - 20 °C (pendant environ 24 h) avant d'être transportés dans un réfrigérateur de voyage puis stockés à - 80 °C à la Station Marine d'Arcachon. Les ganglions d'huitres ont été directement stockés à - 80 °C à la Station Marine d'Arcachon. L'extraction des protéines de ces échantillons biologiques ainsi que leur normalisation et contrôle (deux premières étapes décrites ci-dessous) ont été réalisés à la Station Marine d'Arcachon quelques mois plus tard.

**Extraction des protéines.** Cette étape consiste à isoler et préserver l'ensemble des protéines contenues dans l'échantillon de tissu. Pour cela, la méthode TCA / acétone classiquement employée pour la précipitation et la concentration des protéines totales d'un échantillon a été utilisée. Les principales sous-étapes et leur rôle sont présentés ci-dessous. Tout d'abord, les tissus sont mécaniquement broyés grâce à des billes de silice (MP Biomedicals), à l'aide du matériel MP Fastprep (4.5 Hz, 40 secondes), dans un volume de tampon de solubilisation (PBS, « phosphate buffered saline ») à froid (~ 4 °C). Puis, à un volume récupéré de ce lysat est ajouté l'acétone froide et le TCA (« trichloroacetic acid » ; à 15 % (w/v) final) pour permettre la précipitation des protéines (- 20 °C ; ½ heure). Le tout est ensuite centrifugé à froid et le culot est conservé. Plusieurs étapes successives de lavages et centrifugation sont ensuite réalisées dans l'acétone froid afin d'éliminer toute substance résiduelle pouvant interférer avec la suite des analyses. Finalement, une fois le culot correctement séché, il est remis en suspension et solubilisé dans un tampon Laemmli 1X (2 % SDS ; 10 % Glycerol ; 62,5 mM Tris HCl pH 6,8 ; 5 % 2-Mercaptoethanol ; 0.002 % Bromophenol blue). Les échantillons sont ensuite conservés à - 20 °C.

**Normalisation et contrôles.** Les échantillons sont déposés sur un gel de polyacrylamide. Sous l'effet d'un champ électrique, les protéines chargées négativement (puisque précédemment reprises dans un tampon contenant du SDS) vont migrer au travers des mailles d'acrylamide (Fig. 3.11). Plus les protéines seront grandes moins elles vont migrer rapidement et *vice-versa*. Les buts de cette étape sont (i) d'éliminer les éventuels résidus, qu'ils soient biologiques (acides nucléiques par exemple) ou qu'ils soient des résidus de réactifs issus de l'étape précédente d'extraction, et (ii) de vérifier visuellement la reproductibilité et la quantité du matériel protéique extrait entre différents échantillons.

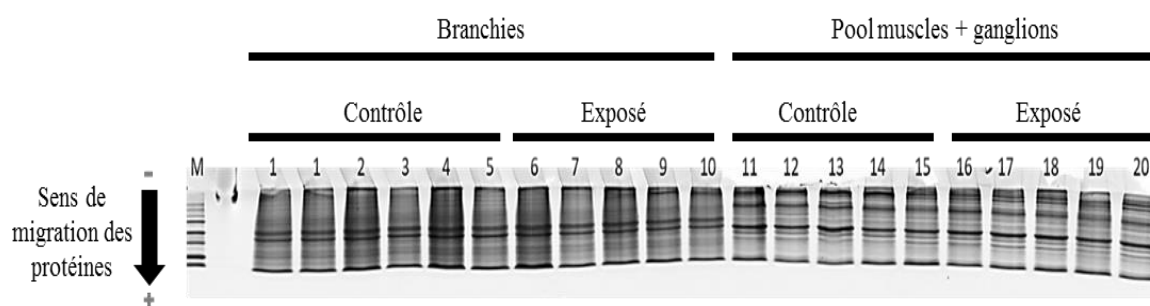


Figure 3.11. Exemple d'électrophorèse monodimensionnelle réalisée pour des échantillons de corbicules. Chaque numéro représente un échantillon. M, Marqueur.

Différentes étapes ont ensuite été réalisées par la plateforme CGFB Protéome. Les points clés sont présentés ci-dessous (Hydrolyse enzymatique par la trypsine, nLC-MS/MS, Assignation des signatures peptidiques).

**Hydrolyse enzymatique par la trypsine.** La trypsine est une protéase qui va couper spécifiquement certaines liaisons peptidiques et donc fragmenter les protéines. On parle également de digestion trypsique des protéines. La trypsine est couramment utilisée dans ce type d'étude. Elle a pour avantages de générer des peptides relativement petits et facilement ionisables.

**Nano-chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem.** La chromatographie liquide (LC) va permettre de séparer les peptides issus des mélanges



peptidiques complexes. Cela va permettre de faciliter leur analyse en spectrométrie de masse et d'augmenter la sensibilité de l'analyse. La nano-chromatographie liquide (nLC) est notamment caractérisée par le faible diamètre des colonnes utilisées, ce qui permet de réduire les volumes de solvants et de gagner en sensibilité. Ce système est couplé à celui de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) pour permettre l'identification et la quantification à partir des données spectrales obtenues. Brièvement, les peptides sont ionisés à la sortie de la colonne chromatographique par électrospray (ESI, ElectroSray Ionisation) pour leur permettre d'être détectés. Ils sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge, fragmentés, puis les fragments sont de nouveau séparés en fonction de leur rapport masse/charge. Ils sont enfin analysés par un détecteur qui va enregistrer le signal des ions (conversion du courant ionique en signal électronique).

**Assignment des signatures peptidiques.** Les peptides identifiés à partir des spectres de masse sont ensuite comparés à des banques de données (les protéines contenues dans ces banques doivent avoir été obtenues, *in silico* le plus souvent, selon les mêmes protocoles de digestion et de fragmentation). Pour ce faire, l'algorithme Sequest est utilisé dans cette étude. Différentes modifications post-traductionnelles principalement induites par l'analyse ont également été prises en compte dans cette étape. La qualité des assignments est ensuite évaluée puis validée statistiquement (False Discovery Rate,  $FDR \leq 0.01$ ) avec l'algorithme Percolator (Käll et al., 2007).

Les différentes étapes d'analyse des données, dont les principaux points sont présentés ci-dessous, ont été réalisées à la Station Marine d'Arcachon à l'aide de deux logiciels en libre accès : le logiciel Perseus (Tyanova et Cox, 2018) et le logiciel Cytoscape (Shannon et al., 2003).

### **Analyse de l'abondance différentielle des protéines.**

**Tests statistiques.** La réalisation successive de milliers de comparaisons d'abondance de protéines entre échantillons indépendants (non-exposés vs exposés) nécessite d'adapter le test statistique utilisé puisque la probabilité d'erreur d'un test utilisant une p-value classique est bien trop importante (déclarer que l'abondance d'une protéine est significative alors qu'elle ne l'est pas, « juste » par hasard). Afin de contrôler le taux de faux positifs

potentiels, le FDR est pris en compte (« False Discovery Rate »). Sa valeur a été adaptée dans chacune de nos analyses en tenant compte, d'une part, du nombre total de positifs potentiels (avec une p-value classique  $\leq 0,05$ ) et, d'autre part, du nombre total de faux positifs potentiels théoriquement dû au hasard (nombre total de comparaison multiplié par 0,05).

**Heatmaps.** Les heatmaps présentes dans nos analyses ont été réalisées avec l'ensemble des protéines considérées comme significatives au seuil FDR choisi. Elles permettent d'obtenir une représentation visuelle des variations d'abondance de chaque protéine dans chaque échantillon biologique grâce à un code couleur défini. Elles ont été générées avec le logiciel Perseus (Tyanova et Cox, 2018). Chaque colonne représente un échantillon biologique et chaque ligne représente une protéine. La normalisation z-score est utilisée pour représenter l'abondance (alors exprimée en logarithme de base 2) de chaque protéine selon la formule : (valeur de l'abondance de la protéine X dans l'échantillon - moyenne de l'abondance de la protéine X dans l'ensemble des échantillons) / écart type des valeurs d'abondance de la protéine X dans l'ensemble des échantillons. Autrement dit, le z-score représente le nombre d'écart type séparant l'abondance de la protéine X dans un échantillon de son abondance moyenne dans l'ensemble des échantillons. Les regroupements verticaux et horizontaux sont définis automatiquement par la méthode du logiciel. La normalisation z-score permet de créer ces regroupements en s'attachant aux variations. Elle rend chaque protéine comparable à une autre.

**Calcul de l'abondance différentielle.** Pour chaque protéine, le niveau d'abondance différentiel (FC, « Fold Change ») a été évalué avec la formule suivante :

$$2^{\log_2(\text{moyenne des échantillons exposés}) - \log_2(\text{moyenne des échantillons non exposés})}$$

Le FC représente bien ainsi le rapport du niveau d'abondance moyen d'une protéine dans une condition par rapport à une autre condition. Il n'est pas exprimé en logarithme de base 2 ( $\log_2$ ) ce qui signifie que les valeurs ne sont pas symétriques par rapport à 1 (une protéine deux fois plus abondante dans une condition que dans une autre aura un FC de 2 alors qu'une protéine deux fois moins abondante aura un FC de 0,5).

## **Analyse des fonctions biologiques.**

**Test d'enrichissement.** Afin de saisir l'information biologique contenue dans les différents regroupements protéiques générés, des tests d'enrichissement ont été réalisés sur chacun. Ces analyses ont été réalisées *via* Cytoscape (Shannon et al., 2003). Un test d'enrichissement consiste à comparer statistiquement des annotations des gènes/protéines dans un groupe spécifique avec celles d'un groupe de référence (transcriptome/protéome total). Le but est de déterminer si des annotations sont significativement surreprésentées au sein du groupe spécifique par rapport au groupe de référence (il y a enrichissement dans ce cas) ou si au contraire, le groupe spécifique est représentatif du groupe de référence (il n'y a pas enrichissement dans ce cas).

**Annotations.** Les annotations ont été réalisées avec les banques de données de « Gene Ontology » (GO) et/ou « KEGG Pathways ». Le consortium GO annote les gènes selon 3 catégories : « biological process », « molecular function » et « cellular component ». Un processus biologique représente un objectif spécifique que l'organisme est génétiquement programmé pour atteindre. Il est accompli par un ensemble particulier de fonctions moléculaires exécutées par des produits géniques spécifiques (ou des complexes macromoléculaires), souvent de manière hautement régulée et selon une séquence temporelle particulière. L'axe « molecular fonction » désigne toute action ou activité que le produit du gène (ou un complexe de produit) effectue. L'axe « cellular component » désigne l'emplacement cellulaire (par rapport aux structures et aux compartiments ou organites) occupé par le produit du gène (ou un complexe de produit) lorsqu'il exerce une fonction moléculaire. La mission de ce projet de bio-informatique est de développer un modèle structuré des termes et concepts liés à la description des gènes et de leurs produits, dans le cadre d'une ontologie commune à toutes les espèces. Le KEGG (« Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ») est une base de données qui cartographie les voies biologiques en se basant essentiellement sur les connaissances acquises en ce qui concerne les interactions moléculaires, les réactions et les relations. Huit grandes catégories d'annotations sont définies : le métabolisme (énergétique, des xénobiotiques par exemple), le traitement de l'information génétique (la transcription, la traduction, ...), le traitement de l'information environnementale (les transports membranaires, la transduction des signaux, ...), les processus cellulaires (la croissance cellulaire, la mort cellulaire, ...), les systèmes de

l'organisme (immunitaires, nerveux, ...), les maladies humaines (cancer, maladies neurodégénératives, ...) et, depuis récemment, le développement de médicaments (chronologie de la biosynthèse, classification des cibles thérapeutiques, ...).

**Représentation graphique.** Pour un résultat plus visuel, les données des tests d'enrichissement sont présentées sous la forme d'un réseau fonctionnel montrant les différentes catégories enrichies, les gènes / protéines impliqués dans chacune de ces catégories ainsi que les différentes interactions existantes entre les gènes / protéines (Bindea et al., 2009, 2013). Chaque nœud représente une catégorie dont l'enrichissement est significatif. La taille des nœuds est calibrée en fonction de leur significativité (plus l'enrichissement est significatif, plus le nœud est gros). Les différents nœuds sont reliés entre eux en fonction de leur score kappa (plus les nœuds sont proches, plus leur concordance est forte). Au sein d'un même groupe, représenté par des nœuds d'une même couleur, seul le label du nœud le plus significatif peut être montré. Les nœuds fonctionnellement très liés peuvent se chevaucher partiellement. La fusion des termes parent-enfant partageant les mêmes gènes / protéines a pu être effectuée afin de diminuer la redondance. Le terme considéré comme le plus représentatif est automatiquement conservé.

### **3.4.3. L'analyse de gènes cibles**

Au cours de mon travail, la quantification relative de l'expression de différents gènes d'intérêt a été réalisée d'une part pour l'étude des perturbations sous-jacentes chez l'huître exposée à la pollution sonore et au cadmium (Chapitre 4 ; Charifi et al., 2018) et d'autre part, lors d'un travail exploratoire, chez les corbicules exposés au pétrole brut en conditions semi-naturelles (résultats non présentés). L'ensemble de ces analyses a été réalisé à la Station Marine d'Arcachon.

Les niveaux d'expression de gènes ciblés pour leurs implications dans différentes voies biologiques d'intérêt ont été mesurés par PCR (« Polymerase Chain Reaction ») quantitative en temps réel (RT-qPCR). Les niveaux d'expression des gènes sont évalués par la quantification des ARNm (Acides RiboNucléiques messagers) résultant de leur transcription (l'expression d'un gène passe par sa transcription en ARNm puis par sa traduction en protéine).

Les grandes étapes de ces analyses et leurs principes sont présentés ci-dessous.

**Dissections et conditionnement des échantillons.** L'ensemble des dissections a été réalisé dans un laps de temps le plus court possible, quelques minutes, à l'issue du prélèvement des organismes placés sur de la glace. Les échantillons biologiques ont été conditionnés individuellement dans des tubes spécifiques (certifiés sans ribonucléase), contenant (i) soit du RNAlater (les échantillons sont conservés sans broyage immédiat), soit (ii) contenant du tampon Trizol (les échantillons sont broyés avant d'être conservés). Le broyage des échantillons est réalisé grâce à des billes de silices (MP Biomedicals) à l'aide du matériel MP Fastprep (6 Hz, 40 sec) dans le tampon Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Ce tampon est une solution de phénol acide, qui participe à la lyse des cellules et conduit à la précipitation des protéines et de l'ADN. Ce tampon contient également de l'iso-cyanate de guanidine qui permet de préserver l'intégrité de l'ARN en inactivant les ribonucléases. Les échantillons sont ensuite conservés à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Extraction des ARN totaux.** L'extraction *via* le tampon Trizol a été réalisée conformément aux instructions fournies par le fabricant. Cette étape va permettre d'isoler l'ARN du reste des constituants cellulaires. Pour cela, un volume de chloroforme est ajouté aux échantillons décongelés. Après agitation et incubation, 3 phases se dessinent. La phase aqueuse supérieure, qui contient les ARN, est conservée. Le chloroforme permet également l'élimination de toute trace de phénol. L'isopropanol ensuite ajouté à la phase aqueuse récupérée permet la précipitation de l'ARN du fait de son insolubilité dans l'alcool. Le précipité formé est ensuite lavé plusieurs fois avec de l'éthanol à 75 %. Ces lavages successifs permettent d'éliminer les éventuels restes de Trizol, de chloroforme et d'isopropanol qui pourraient fausser les dosages. Le précipité est ensuite séché à l'air libre et les ARN sont solubilisés dans de l'eau spécifique certifiée sans ribonucléases. Afin de normaliser la quantité d'ARN extraite entre les échantillons (par une dilution), des analyses d'absorbance sont réalisées au spectrophotomètre. Les échantillons sont par suite conservés à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Rétro-transcription en ADNc.** Les ARN sont des molécules peu stables et impossibles à quantifier en tant que tels. Leur quantification passe par leur transformation en ADNc (ADN

complémentaires). Avant de synthétiser le brin d'ADNc, les échantillons sont traités avec de la DNase pour éliminer l'ADN génomique encore potentiellement présent. La synthèse d'un brin d'ADN complémentaire est réalisée grâce à une enzyme, la Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase, présente chez les rétrovirus qui fabriquent un brin d'ADN à partir d'un brin d'ARN. La fixation des amorces utilisées pour initier la transcription inverse est facilitée par une étape préalable de chauffage permettant la linéarisation des ARN (80 °C, 3 min). Les amorces utilisées sont des oligodT qui s'hybrident sur la queue poly(A) des ARN messagers et des hexaprimers (associations aléatoires de six nucléotides) qui se fixent sur les ARNm plus longs et les ARNm mitochondriaux qui ne disposent pas de queue poly(A). Une fois les brins d'ADN complémentaires synthétisés, grâce à différentes températures et temps d'application permettant l'hybridation des amorces (20 °C, 3 min) et la synthèse du brin complémentaire (42 °C, 60 min), ils sont quantifiés par RT-qPCR.

**Quantification par RT-qPCR.** La RT-qPCR est une technique d'amplification cyclique d'une séquence cible d'ADN *via* l'utilisation d'amorces spécifiques pour la reconnaître. La quantité d'ADN amplifié augmente de façon exponentielle en fonction du temps puisque les produits formés à chaque cycle sont utilisés comme matrice pour le cycle suivant. Leur détection se fait avec le SYBER green I, un agent intercalant de l'ADN qui ne fluoresce qu'à cette condition. La fluorescence est donc directement proportionnelle à la quantité d'ADNc double brin et donc à la quantité initiale d'ARN présente dans l'échantillon. Dans nos analyses, 40 à 50 cycles d'amplification ont été réalisés (Fast 2 Step ; MxPro QPCR). Chaque cycle comporte deux grandes phases : (i) séparation des doubles brins en simples brins (10 sec, 95 °C) et (ii) appariement des amorces spécifiques de la séquence à amplifier, élongation du brin complémentaire grâce à une enzyme, la Taq polymérase qui fixe les dNTP (30 sec, 60 °C). Le cycle seuil Ct (« Threshold Cycle ») correspond au nombre de cycles nécessaires pour permettre l'entrée dans la phase exponentielle d'amplification. Il permet de quantifier l'expression relative d'un gène dans un échantillon. Plus il est petit, plus le nombre de séquences cibles initialement présentes dans l'échantillon était important, et donc plus le gène était exprimé. Afin de vérifier la fiabilité des analyses, chaque échantillon est analytiquement dupliqué durant cette étape. Si la reproductibilité est validée, les Ct des dupliquas sont moyennés. Les courbes de dissociation sont également vérifiées.

**Design préalable des amorces.** Les amorces détectent la séquence d'ADNc à amplifier et s'hybrident sur celle-ci pour initier la transcription. Les amorces ont été dessinées avec PrimerQuestTool et remplissent différentes conditions (fixation de préférence en fin de séquence,  $T_m$  particulier, longueur de  $20 \pm 2$  nucléotides, pourcentage de bases guanine et cytosine de  $50 \pm 5$  %). Leur spécificité a été vérifiée *via* l'analyse des Ct obtenus à la suite de cascades de dilutions standards réalisées pour un échantillon.

**Calcul de l'expression différentielle.** Le choix du gène de référence est essentiel pour ce calcul. Il doit être le plus stable possible quels que soient les échantillons. Dans notre analyse, le gène de référence a été choisi avec l'utilisation de logiciels spécifiques (BestKeeper, geNorm et Normfinder). Les données ont ensuite été traitées avec la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  décrite par Livak et Schmittgen (2001).

### 3.4.4 L'analyse de la contamination

**Contamination par les HAP.** L'ensemble des dosages de HAP a été réalisé par le Centre de documentation, de recherche et d'expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux (Cedre, Brest). À l'issue des dissections, les échantillons de tissu ont été individuellement conditionnés à l'aide de papier aluminium et directement congelés à  $-80$  °C. Au cours de leurs différents transits, la chaîne de congélation n'a jamais été rompue (Lacq → Arcachon → Brest pour les tissus de corbicules et Arcachon → Brest pour les tissus d'huitres). Pour l'ensemble des analyses présentées, 21 HAP parents dont les 16 listés comme prioritaires par l'US EPA (naphtalène, benzothiophène, biphenyle, acénaphthylène, acénaphène, fluorène, dibenzothiophène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a) anthracène, chrysène, benzo(b) fluoranthène, benzo(k) fluoranthène, benzo(e) pyrène, benzo(a) pyrène, pérylène, indeno(1,2,3-cd) pyrène, dibenzo(a,h) anthracène, benzo(g,h,i) perylène) ont été recherchés chez les corbicules (expérimentation en conditions semi-naturelles, analyses présentées dans le Chapitre 5, § 5.2) et chez les huitres (expérimentations de laboratoire n° 2 et 3, analyses présentées dans le Chapitre 5, § 5.3 et le Chapitre 7). Pour l'ensemble des analyses, deux composés, le benzo(b) fluoranthène et le benzo(k) fluoranthène, ont été quantifiés en tant que somme appelée benzo(b+k) fluoranthène, du fait d'une faible résolution de ces derniers. Trois HAP alkylés (1-méthylnaphtalène, 2-méthylnaphtalène, 2-méthylfluoranthène) ont été analysés en plus dans

certains échantillons d'huitre (expérimentation de laboratoire n° 2 ; analyses présentées dans le Chapitre 5, § 5.3). Pour l'ensemble des échantillons d'huitres (expérimentations de laboratoire n° 2 et 3, analyses présentées dans le Chapitre 5, § 5.3 et le Chapitre 7), les concentrations de trois composés (l'indeno(1,2,3-cd) pyrène, le dibenzo(a,h) anthracène et le benzo(g,h,i) perylène) n'ont pas pu être déterminé du fait d'une perte de sensibilité de l'appareil. L'ensemble de ces analyses a été effectué par SBSE-TD-GC-MS/MS (Stir bar sorptive extraction-désorption thermique-chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse en tandem ; Lacroix et al., 2014). Brièvement, chaque échantillon a été digéré par digestion alcaline puis les analytes ont été extraits pendant 2 h sous agitation à 700 rpm à l'aide de barreau magnétique en polydiméthylsiloxane (Twister 20 mm x 0.5 mm, Gerstel). Les barreaux ont ensuite été analysés à l'aide d'un système de chromatographie gazeuse Agilent 7890A couplé à un détecteur de masse Agilent 7000 triple quadripôles (Agilent Technologies) équipé d'une unité de désorption thermique combinée avec un système de cryofocalisation. Les conditions d'analyses sont similaires à celles précédemment décrites (Lacroix et al., 2014). Les analytes ont été quantifiés relativement à un étalon deutéré, en utilisant une courbe de calibration comprise entre 0,01 ng et 10 ng sur barreau. Les limites de quantification (LQ) ont été calculées par la méthode de la courbe de calibration (Shrivastava et Gupta, 2011). Les limites de détection (LD) ont été estimées en divisant la LQ par 3. Les valeurs obtenues pour les blancs analytiques étaient systématiquement inférieures aux LQ. En ce qui concerne les analyses réalisées sur les huitres, la méthode a été validée en analysant le matériel de référence NIST-SRM 1974c (moules) et en réalisant des ajouts dosés. Les données obtenues par GC-MS et GC-MS/MS ont été analysées respectivement à l'aide des logiciels de traitement de données MSD Enhanced chemstation et Agilent MassHunter Quantitative Analysis (Agilent Technologies). Pour les représentations graphiques et les calculs des sommes, les concentrations inférieures aux limites de quantification sont considérées comme égales à 0.

**Contamination par le cadmium.** Le dosage du Cd a été réalisé dans les tissus des huitres exposées au Cd seul et au Cd plus pollution sonore (Chapitre 4 ; Charifi et al., 2018). Le Cd a été utilisé dans cette expérimentation comme un marqueur indirect de l'activité ventilatoire des huitres en présence ou absence de pollution sonore. On ne pouvait pas utiliser le pétrole brut car contrairement au cadmium qui ne modifie pas les activités ventilatoires et cardiaques aux concentrations utilisées (Pierron et al., 2007), le pétrole



pourrait les modifier durablement au vu du comportement valvaire. À l'issue des dissections, les tissus ont été préservés à - 20 °C dans des tubes spécifiques préalablement nettoyés (bain d'eau régale à 5 % pendant 72 h et rinçage à l'eau ultra-pure). Avant d'être analysés, les échantillons ont été placés en étuve à 45 °C pendant 48 h puis minéralisés. En fonction de leur poids sec, un volume d'acide nitrique 65 % leur a été ajouté. Les échantillons acidifiés ont ensuite été chauffés 3 h à 100 °C. Une fois refroidi, un volume d'eau ultra pure correspondant leur a été ajouté. Selon le même principe, des blancs ainsi que des échantillons certifiés ont été réalisés (DOLT-5 ; National Research Council of Canada). Après cette étape, les concentrations en Cd ont été déterminées par spectrométrie d'absorption atomique avec correction de Zeeman à l'aide d'un four graphite (240Z AA spectrometer, Agilent Technologies). La limite de détection pour le Cd est de 0,075 µg·L<sup>-1</sup>. L'étalonnage de l'appareil a été réalisé à l'aide d'une gamme de solutions étalons standards. Les échantillons, préalablement additionnés d'une solution de nitrate de magnésium et de sulfate de palladium, y ont subi différents traitements thermiques (séchage, 120 °C, 40 sec ; pyrolyse, 250 °C, 5 sec ; minéralisation, 600 °C, 25 sec ; atomisation, 1800 °C, 3 sec) sous atmosphère d'argon. À l'issue de l'étape d'atomisation, l'absorbance de l'échantillon est mesurée grâce à une lampe à cathode qui génère une émission atomique spécifique du Cd et différents capteurs qui enregistrent l'intensité des signaux d'émission avant et après absorption. Les concentrations des échantillons analysés ont ensuite été déduites *via* le report de leur absorbance sur la droite d'étalonnage préalablement obtenue, en tenant compte de leurs caractéristiques (poids, dilution).

# CHAPITRE 4

EFFETS DE LA  
POLLUTION SONORE  
CHEZ LES BIVALVES



## 4.1 Introduction

Comme nous l'avons écrit dans l'Introduction, de nombreux paramètres environnementaux, qu'ils soient naturels ou anthropiques, sont en mesure de modifier le comportement des mollusques bivalves. Parmi les paramètres considérés comme d'intérêt dans le cadre de notre étude, la pollution sonore en milieu aquatique était celui dont on ne connaissait que très peu de choses. Or une plateforme pétrolière est un milieu extrêmement bruyant (Rossi-Santos, 2015). En cause les multiples pompes qui y sont utilisées. Une raffinerie accueille des cargos de fort tonnage. Plateformes et gros cargos génèrent des fréquences sonores dans la gamme basse, le spectre audible par les mollusques bivalves (Charifi et al. 2017). J'ai donc profité de la fin de la thèse de Mohcine Charifi pour travailler avec lui sur l'impact que pouvaient avoir des basses fréquences ( $< 1$  kHz) sur le comportement, l'activité ventilatoire et les processus de contamination chez l'huitre *M. gigas*. Ce chapitre se propose donc d'être vu comme un travail de base nécessaire à la bonne réalisation et compréhension du sujet principal de la thèse.

## 4.2 Article: Noise pollution limits metal bioaccumulation and growth rate in a filter feeder, the Pacific oyster *Magallana gigas*

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194174>

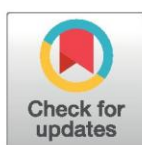
RESEARCH ARTICLE

# Noise pollution limits metal bioaccumulation and growth rate in a filter feeder, the Pacific oyster *Magallana gigas*

Mohcine Charifi<sup>1,2,3</sup>, Alison Miserazzi<sup>1,2</sup>, Mohamedou Sow<sup>1,2</sup>, Mickael Perrigault<sup>1,2</sup>, Patrice Gonzalez<sup>1,2</sup>, Pierre Ciret<sup>1,2</sup>, Soumaya Benomar<sup>3</sup>, Jean-Charles Massabuau<sup>1,2\*</sup>

**1** University of Bordeaux, EPOC, Arcachon, France, **2** CNRS, EPOC, Talence, France, **3** Unit of Research on Biological Rhythms, Neuroscience and Environment, Faculty of Science, Mohammed V-Agdal University, Rabat, Morocco

\* [jean-charles.massabuau@u-bordeaux.fr](mailto:jean-charles.massabuau@u-bordeaux.fr)



## Abstract

Shipping has increased dramatically in recent decades and oysters can hear them. We studied the interaction between noise pollution and trace metal contamination in the oyster *Magallana gigas*. Four oyster-groups were studied during a 14-day exposure period. Two were exposed to cadmium in the presence of cargo ship-noise ( $[Cd^{++}]_w \approx 0.5 \mu g \cdot L^{-1}$ ; maximum sound pressure level 150 dBrms re  $1 \mu Pa$ ), and 2 were exposed only to cadmium. The Cd concentration in the gills ( $[Cd]_g$ ) and the digestive gland ( $[Cd]_{dg}$ ), the valve closure duration, number of valve closures and circadian distribution of opening and closure, the daily shell growth-rate and the expression of 19 genes in the gills were studied. Oysters exposed to Cd in the presence of cargo ship-noise accumulated 2.5 times less Cd in their gills than did the controls without ship noise and their growth rate was 2.6 times slower. In the presence of ship noise, oysters were closed more during the daytime, and their daily valve activity was reduced. Changes in gene activity in the gills were observed in 7 genes when the Cd was associated with the ship noise. In the absence of ship noise, a change in expression was measured in 4 genes. We conclude that chronic exposure to cargo ship noise has a depressant effect on the activity in oysters, including on the volume of the water flowing over their gills (Vw). In turn, a decrease in the Vw and valve-opening duration limited metal exposure and uptake by the gills but also limited food uptake. This latter conclusion would explain the slowing observed in the fat metabolism and growth rate. Thus, we propose that cargo ship noise exposure could protect against metal bioaccumulation and affect the growth rate. This latter conclusion points towards a potential risk in terms of ecosystem productivity.

## OPEN ACCESS

**Citation:** Charifi M, Miserazzi A, Sow M, Perrigault M, Gonzalez P, Ciret P, et al. (2018) Noise pollution limits metal bioaccumulation and growth rate in a filter feeder, the Pacific oyster *Magallana gigas*. PLoS ONE 13(4): e0194174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194174>

**Editor:** José A. Fernández Robledo, Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, UNITED STATES

**Received:** November 27, 2017

**Accepted:** February 26, 2018

**Published:** April 4, 2018

**Copyright:** © 2018 Charifi et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This study was supported by grants from Campus France, ANR (ANR-15-CE04-0002-02 WAQMOS), NEUROMED, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médical (INSERM), the GDRI de Neurosciences, n 198, Embassy of France, Institut Français in Morocco, the MolluSCAN Eye Project, and the Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique

## Introduction

Aquatic animals are subjected to numerous sensory inputs, including biological and physical effects of natural and anthropogenic origins. Unlike chemical and visual stimuli, sound is transmitted in water over several kilometers with less attenuation [1]. Sound is biologically

(CNRST) to M.C.. TOTAL R&D provided a grant (no. FR00008208) to A.M.. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have read the journal's policy and have the following conflicts: A. M. received funding from TOTAL R&D. There are no patents, products in development, or marketed products to declare. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

essential to marine animals [2–5], but noise pollution is a growing problem because it interferes with the normal sound landscape. Indeed, in recent decades, human activity in the ocean has increased considerably along with economic growth [6], causing an increase in the level of ocean ambient noise [7]. For example, the noise pollution caused by shipping results in an increase in the level of ambient noise at an average rate of approximately ½ dB per year since the 1950s [8,9]. Shipping is now largely recognized as a major source of pollution and has been introduced as one of the 11 descriptors of the Marine Strategy Framework Directive (MSFD) to achieve a Good Environmental Status (GES).

Several studies have reported on the adverse effects of noise pollution in marine animals. Noise pollution can have different effects (see Peng et al. [10] for a review), depending on the intensity and frequency of the transmitted noise and the distance of the animal from the source. However, a great gap in our understanding still exists on the effects of noise on marine animals, especially in fish and invertebrates [11].

The small amount of studies on the impact of noise pollution on invertebrates [12–14], especially on bivalve mollusks, does not in any way reflect the importance of invertebrates to the ecosystem. Mosher [15] was probably the first who published on sound detection in bivalve mollusks. He reported an induced burrowing behavior in the Baltic clam or Baltic tellin *Macoma balthica* when the wall of its experimental tank was stimulated with 2–50 Hz. Then, Ellers [16] studied the swash-riding clam and demonstrated its ability to detect vibrations produced by the waves on sandy beaches. More recently, while studying the blue mussel *Mytilus edulis*, Roberts et al. [17] examined the impact of substrate-borne vibrations and demonstrated the sensitivity of the mussel to a range of low frequencies. Solan et al. [18] reported that a noise mimicking offshore shipping and construction activity may alter the mediating contributions made by sediment-dwelling invertebrates in the process of nutrient cycling. They reported that additional noise causes behavioral disturbances and a reduction in surface relocation activity. In another study on the razor clam, Peng et al. [19] detected variation in the burrowing behavior and the expression of metabolic genes in response to a change in the noise intensity from 80 to ≈100 dB re 1 μPa. Such a change causes the clam to escape deep into the mud and enter a state of inactivity. Finally, Charifi et al. [20] described the capacity to hear in the Pacific oyster *Magallana gigas* (formerly *Crassostrea gigas*) and discussed the role this response could play in the lives of these oysters today. Based on the above dataset showing how anthropogenic noise can shape bivalve behavior, we hypothesized that this noise could also induce changes in the volume of the water flow during ventilation and thus interfere with the contaminant bioaccumulation process and/or other physiological mechanisms. The aim of the present report was to test this hypothesis in the widely distributed Pacific oyster *M. gigas*.

*Magallana gigas* (Thunberg, 1793) is a common oyster species that has been introduced extensively around the world for aquacultural purposes. It is a filter-feeding animal of major economic interest and often is used as a bioindicator of the state of the marine environment [21]. The present study investigated the effect of noise pollution and its interference with metal pollution. Behavioral, ecophysiological, and genic analyses were conducted because, when considered in combination, they may provide larger insights into the perturbation of the organism.

Animals were exposed to cadmium to obtain insights, on the one hand, of the cellular impact of the metal in the presence and absence of cargo ship noise and, on the other hand, as an indirect marker of ventilatory activity. Indeed, when a constant concentration of trace metal is maintained in the water, variation in ventilatory activity is a limiting step that acts on metal bioaccumulation in fish, mollusks, and crustaceans [22–28]. A high ventilatory flow in the gills strongly enhances the accumulation of Cd in the soft tissues and vice versa. In shrimps, changes in the ventilatory activity modulates the Cd bioaccumulation, but [Cd]w

alone does not influence ventilatory and cardiac frequency [28]. Noise from cargo ship was chosen because it is one of the largest contributors to ocean noise pollution. The two other most significant sources are oil and gas exploration and military sonar. The cargo ship contribution is greatest in coastal areas which are hotspots of biodiversity.

## Materials and methods

### Animals and experimental design

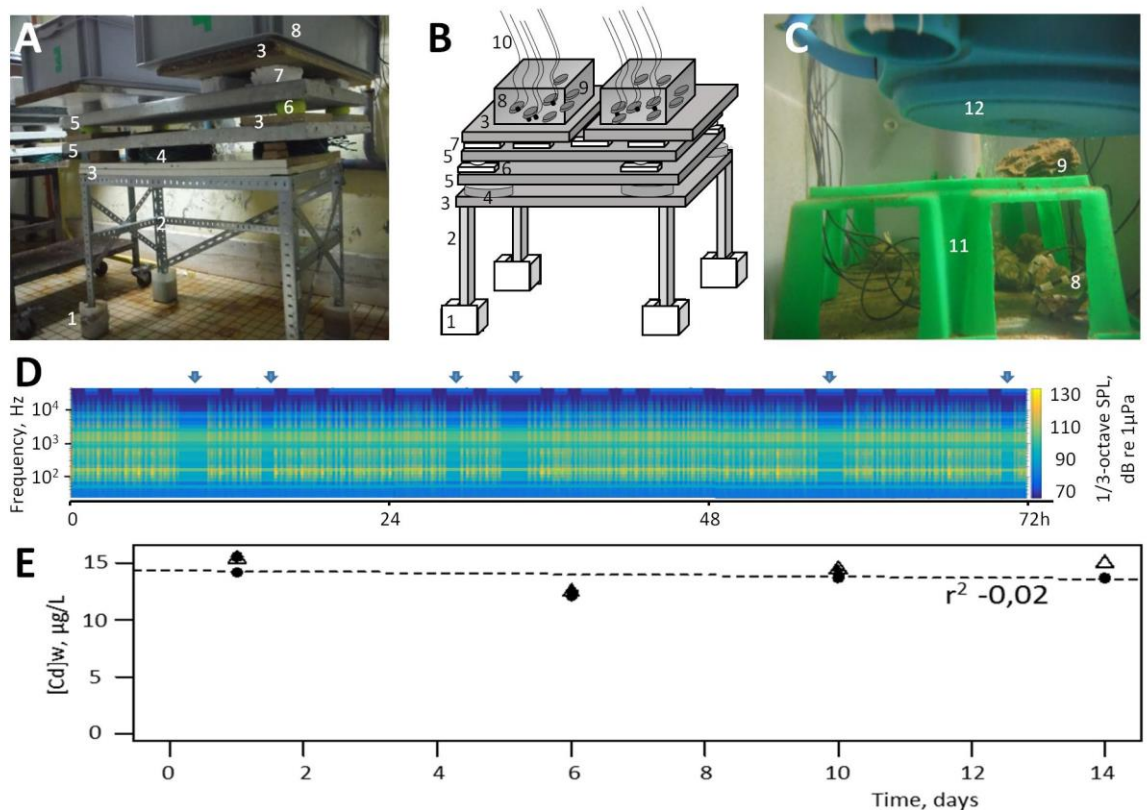
Experiments were performed at Arcachon Marine Station, on the French Atlantic coast, from October to November 2016. A total of 120 18-month-old diploid Pacific oysters *M. gigas* (70–75 mm) were purchased from a local oyster farmer in Arcachon Bay and maintained in large tanks (200 L) filled with running unfiltered seawater pumped directly from the bay. Arcachon Bay experiences low-density marine traffic composed of recreational and small fishing ships (most of them < 10 m).

The experiment was conducted in an isolated room to limit external influences on the oyster behavior. Care was taken to reduce human activity and noise disturbance. Four identical polyvinylchloride tanks (78 x 39 x 19 cm) were used, with animals being acclimated to the experimental conditions for a week. The tanks were supplied with unfiltered sea water with a controlled renewal rate of 130 mL/min using a flowmeter (Cole-Parmer, USA). Water flow was piped underwater, thereby minimizing the noisy disruption of water-surface and background noise. Before and during the test exposures, oysters received 0.4 g of dehydrated algae (ReefMist Planktonic, Aquarium System) for feed once a day before the lights were extinguished to optimize food uptake by the oysters. Animals were subjected to a light cycle of L:D 13:11 in the absence of a tidal cycle, and the water was air-equilibrated by slow bubbling air stones set in airlifts to homogenize the water volume and limit unnecessary noise. Physical parameters were monitored during all experiments and maintained at 14–15°C; pH, 7.8–8.0; and salinity, 32–34/1000. Among the four tanks, two (replicates) were dedicated to the cadmium and cargo ship noise test; two (replicates), to the cadmium only test. Eight animals per tank were equipped with electrodes for behavioral measurements (8 x 2 replicates = 16 oysters per condition; see below).

Due to its acoustical mismatch, the air-water interface causes the reflection of a large part of the acoustical energy [29]. Therefore, the main conduct of unwanted sound transmission into the tanks was through the base. To limit ground vibrations, tanks were installed on an anti-vibration bench. The system is composed of 12 layers of different materials (Fig 1A and 1B) composed of a plastic box, sand, chipboard, inner tubes, concrete, tennis balls, polystyrene boards, and PVC) to absorb extraneous vibrations and to prevent parasite disturbance of the oysters' ventilatory activities [30]. Two suspended loudspeakers were installed face down in the two replicate tanks dedicated to the Cd and noise exposure. They were positioned at the center and 12 cm from the bottom (Fig 1A).

Exposure protocol.  $T_0$  was taken as the first day of exposure to cadmium, and  $T_0$ - $T_{14}$  was the exposure period to cadmium with or without the cargo ship noise. After an acclimation period of 6 days to the experimental tanks (from  $T_{-11}$  to  $T_{-5}$ ), oysters placed in the two tanks equipped with loudspeakers were exposed to cargo ship noise (from  $T_{-5}$  to  $T_{14}$ ; Fig 1D) while the two reference tanks (no noise) remained in a reference condition ( $T_{-5}$  to  $T_0$ ). During the test, the loudspeakers were switched off every day from 09 h 00 to 11 h 00 during animal sampling (Fig 1C).

From  $T_0$  to  $T_{14}$ , metal contamination was initiated in all four tanks with the addition of  $\text{CdCl}_2$  from a stock solution (Titrisol®, Merck). The average concentrations in tanks 1 and 2 with cargo ship noise were respectively  $13.91 \pm 0.72 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $13.78 \pm 0.71 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . It was



**Fig 1. Experimental setup and exposure characteristics.** A, antivibration bench with 2 replicate tanks on it; B, complete scheme of a unit; C, inside view of an experimental tank. 1, sand; 2, frame angle structure; 3, chipboard panel; 4, air chambers; 5, concrete slab; 6, tennis ball; 7, pieces of thermal insulation; 8, oysters equipped for behavioral recordings; 9, oysters for tissue sampling; 10, electrode cables; 11, hemstitched support; 12, loudspeaker. D, 72 h of sound recording. Each vertical bar is the noise from one passing cargo ship. Black bands represent periodic absence of cargo ship noise. E: the change of cadmium concentration in the 4 tanks as a function of time. There were 2 antivibration benches and 2 replicate tanks per bench.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194174.g001>

respectively  $14.32 \pm 0.64 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $13.59 \pm 0.39 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for tanks 3 and 4 without cargo ship noise (means  $\pm 1$  SE; Fig 1E). The expected maximum free Cd concentration was  $< 3\text{--}4\%$  of the total Cd, only taking into account the inorganic complex (MINEQL+, V5) that is  $\leq 0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Five oysters without HFNI electrodes were randomly sampled at  $T_0$ ,  $T_3$ , and  $T_7$ , and seven were sampled at  $T_{14}$  in each tank to give  $n = 10$  or  $14$  per experimental condition and exposure period. The gills and digestive gland were immediately sampled and divided into two parts: one for measuring the concentration of Cd in the tissues and one for cDNA synthesis and quantitative PCR. The samples were stored at  $-20^\circ\text{C}$  for metal determination and fixed as explained below for genic analysis.

### Sound production and recordings

Playback tracks were created from original recordings made at Santander Harbor (Spain). During these recordings, the hydrophone was positioned at a depth of 2 m, with cargo ships passing at a distance of approximately 500 m. Due to port regulations, the ships were estimated to be sailing at a speed  $\leq 9$  knots. Weather conditions were calm (wind force 3 on the Beaufort scale). A noise generated by one passing ship was randomly picked. The selected noise of



12-min duration was modified using a sound program interface (Cool Edit, version 2.0, Syntrillium Software Corporation, USA) to obtain two records with two different amplitudes and with frequencies from 20–20,000 Hz: one passing ship had a maximum amplitude of 150 dBrms re 1  $\mu$ Pa, and the other had a maximum amplitude of 138 dBrms re 1  $\mu$ Pa. The noise record is provided as supporting information (S1 File).

Three different playbacks of 1-hour duration each were created. The tracks contained, respectively, three, four, and five passing ships alternating large and small amplitudes with silent periods in between for a total of 92 noise exposure periods per day (Fig 1D). This is a value representative of active ports (<https://www.marinetraffic.com/>). The three playbacks were randomly dispersed over a period of 3 days, and the final track was looped for the experimental exposure. Sound was played back as a wave file through a loudspeaker (model: US-0130, Rondson Public Address, France) using an amplifier (AM60A, Rondson, France) and Cool Edit as an audio interface.

Acoustic conditions were recorded using a broadband hydrophone with an internal buffer amplifier (model: H2a-XLR, sensitivity -180 dB re 1 V/ $\mu$ Pa, useful range: 10 Hz to 100 kHz, Aquarian product) and an Edirol recorder (H4n Handy, Zoom Corporation, Japan) that was level-calibrated using a pure sine wave signal with a measured voltage recorded in line on an oscilloscope. Recordings were made (6 cm) above the tank floor and 12 cm from the loudspeaker.

As reported by Rogers et al. [31], measuring particle velocity in small tanks is a challenge. In this experiment, we measured acceleration directly on *in situ* oysters by attaching a Dytran accelerometer (3217A-10) to the shell of a test specimen [20]. Its certified sensitivity varied from 100.38 mV/g at 20 Hz to 96.96 mV/g at 1000 Hz, and we used it with a Dytran amplifier (M28 IEPE, gain x 1) and a 100x laboratory-made amplifier. The accelerations were measured at different positions in the tanks (Fig 1C) and ranged from 0.32–0.43  $\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$  at 150 dBrms re 1  $\mu$ Pa and from 0.06–0.08  $\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$  at 138 dBrms re 1  $\mu$ Pa.

### Oyster behavior recording

As explained by Andrade et al. [21], the recording apparatus consisted of lightweight electromagnets (56 mg) glued to each valve and connected by flexible wires to a laboratory-made valvometer. The device measures current which varies according to the distance between the electrodes. For this experiment, the sampling frequency was 3.3 Hz, and according to that frequency, the opening status of each oyster was measured every 4.8 sec.

Data were transmitted via an acquisition card (Ni-USB-6009, National instrument, Austin, TX, USA) and recorded by a computer using a laboratory-made script in Labview (National instrument). Data were also processed automatically using routines and published online on the professional pages of the MolluSCAN eye website <https://molluscan-eye.epoc.u-bordeaux.fr/index.php?rubrique=accueil&lang=en&site=EYRAC>.

In bivalves, a change in the valve behavior could indicate a disturbance in the surrounding environment. The main interest of such a device was to collect online different parameters without interfering with the normal behavior of the bivalves: valve closure duration, valve partial closure and growth rate. The valve closure duration is based on the measurement of the time spent by the oyster closed, which can be calculated hourly or for the entire day. Measurements are based on the use of several thresholds. Thresholds are calculated while considering the minimum and maximum opening amplitude for each oyster over 24 hours. Different thresholds could be chosen (5%, 30%, 55%, and 80%) depending on the studied parameter. An actogram was used to represent the temporal distribution of the valve opening duration activity for the oyster group. Each line in the actogram represents the group's activity in 24 hours.

A daily mean activity was calculated for the group. For each time slot, the mean hourly activity of the group was compared with the calculated daily mean activity. When the activity was below the average, it is represented with a white bar code, whereas values above the average are represented with a black bar code. The actogram can be calculated at different thresholds. In this study, the 5% threshold was chosen because it allows differentiating between opened and closed.

The valve closure duration is the percentage of the ratio between the maximum and minimum opening amplitude of the oyster for the whole day. The hourly valve closure duration could also be expressed as a percentage at different thresholds. A duration of 100% corresponds to an oyster being continuously opened for 1 hour, and 0% corresponds to an oyster being closed for the entire hour. Intermediate values are possible.

Valve partial closure is calculated from the sum of the detected partial closures for a given time for each animal at different thresholds. In the present experiment, the 80% thresholds were used for partial-closure calculation, as this was appropriate.

Growth rate can be estimated using valvometry. As calcification in bivalves occurs in the mantle cavity, when daily growth layers are deposited, the minimum distance between the electrodes glued to the shells increases, thereby providing a good index of growth. By plotting these values of minimal daily valve opening as a function of time, one obtains growth curves [32]. For each condition, no significant difference was observed between the duplicates, and the data were pooled together.

### Cadmium contamination and determination

Cadmium concentration in the water was maintained and monitored during all experiments. Cadmium was pumped at a rate of 0.24 mL/min and injected in the inflow pipe using a peristaltic pump (Gilson, France). Water aliquots, filtered at 0.45  $\mu\text{m}$ , were collected daily in the experimental tanks to monitor water contamination. After acidification and dilution of the aliquots, the cadmium contamination was measured with ICP (Inductive Coupled Plasma. Model: 700 series ICP-OES, Agilent Technologies). Oyster samples (gills and digestive gland) were dried for 48 h at 45°C and then digested with nitric acid (Nitric Acid 65%, Carlo Erba Reagents, France) in a Teflon tube at 100°C for 3 h. The resulting solutions were diluted with ultrapure water (Purite Select Purification System), and cadmium concentrations were determined by atomic absorption spectrometry with Zeeman correction (Model: 240Z AA, Agilent Technologies). To avoid interference, samples were mixed before atomization with a 1-mL mixture of 50% Pd + 50% Mg ( $\text{NO}_3$ )<sub>2</sub>. The method was simultaneously checked for each sample series against certified biological reference materials (Dolt-5, National Research Council Canada). Values were consistently within certified ranges. Metal concentrations were expressed as ( $\mu\text{g/g}$ ) dry weight tissue. No significant difference was observed between the oysters in replicate tanks under the same experimental conditions. Thus, data were pooled together.

### cDNA synthesis and quantitative PCR

Gill samples of oysters were individually processed for RNA extraction using TRI Reagent® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Total RNA quality and quantity were estimated by spectrophotometer (Epoch, Biotek®), and reverse transcription was realized with 4  $\mu\text{g}$  total RNA, oligo dT17, and Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA).

Nineteen genes were chosen to encode the proteins involved in the various metabolic pathways. For each candidate, specific primers were designed from the sequence of *M. gigas*

available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database or selected from the literature (Table 1). The PCR efficiency of each primer pair was realized by determining the slope of the standard curve obtained from the serial dilution analysis of cDNA. Real-Time quantitative Polymerase Chain Reactions (RT-qPCR) were performed in an Mx3000P (Stratagene®) with GoTaq qPCR Master Mix (Promega®, Madison, WI, USA) and a concentration of 100 nM for each primer according to the manufacturer's instructions. The amplification program starts with 3 min at 95°C to activate the DNA polymerase, followed by 50 cycles of 10 sec at 95°C and 30 sec at 60°C. Reaction specificities were confirmed by a melting curve (from 65°C to 95°C). Five potential housekeeping gene (*12s*, *ef1α*, *rpl7*, *gapdh*, *actb*) was tested using BestKeeper, geNorm and Normfinder and *12s* gene was sectioned. The expression of transcripts levels in each oyster was quantified by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method described by Livak and Schmittgen [33].

### Statistics

Comparisons between variables were investigated using analysis of variance (ANOVA) after checking for assumptions of normality and homoscedasticity of error term. For significant differences, the Tukey's Honest Significant Difference (Tukey's HSD) was used for all pairwise comparisons. When assumptions were not met, the Kruskal-Wallis test was applied, and the Dunn test was considered for all pairwise comparisons. Differences between distributions were assessed using a two-sample Kilmogorov-Smirnov test, and differences between variances were assessed using a Levene test. For all statistical results, a probability of  $p < 0.05$  was considered significant. Data were computed and analyzed using R software [40]. All data are provided as supporting information (S1 Database).

## Results

### Cadmium accumulation

Cadmium concentrations in the gills ([Cd]g) and the digestive glands ([Cd]dg) of the oysters exposed to Cd with or without cargo ship noise are reported in Fig 2. After 14 days of Cd exposure, the gills of oysters exposed to cargo ship noise accumulated 2.5 times less than the oysters without ship noise ([Cd]g =  $132.6 \pm 14.2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry w in noise-exposed oysters versus  $323.2 \pm 61.4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  dry w in non-exposed oysters;  $p = 0.009$ ). From  $T_3$  to  $T_{14}$ , the [Cd]g increased by 480% in the absence of ship noise and only 48% in the presence of cargo ship noise. By contrast, in the digestive gland, which accumulated 4–8 times less Cd than the gills, no significant difference was observed between the noise conditions regardless of the exposure duration ( $p = 0.137$  at  $T_{14}$ ).

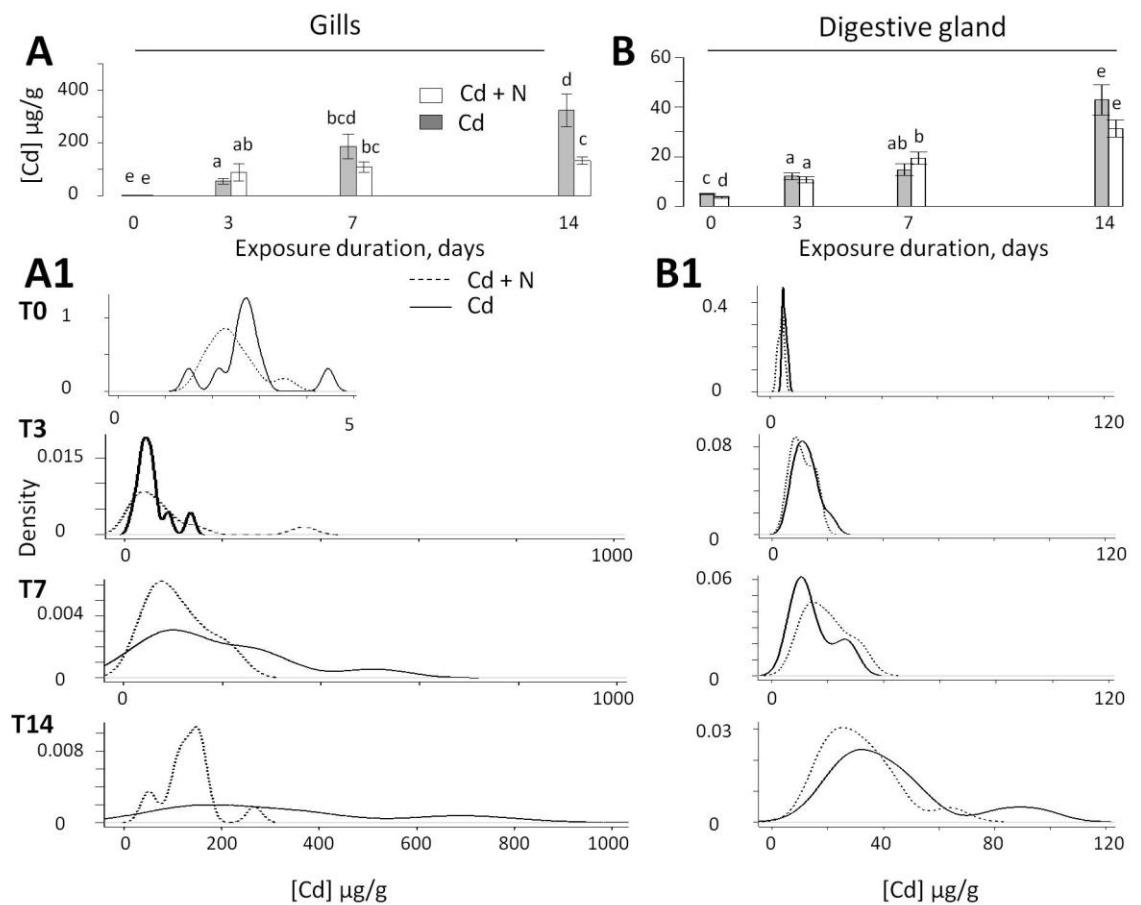
The distributions of cadmium accumulation in the two oyster groups all along the exposure period are presented in Fig 2A1 and 2B1. Fig 2A1 shows that the difference between the oysters exposed and not exposed to cargo noise was mainly explained by the absence of the most contaminated gill samples in the cargo-noise-exposed condition. After 14 days, the distributions in the two conditions became significantly different ( $p = 0.0049$ ), but at  $T_3$  and  $T_7$ , the higher contaminations levels were already associated with the absence of cargo ship noise. In the digestive glands, the cadmium level distribution in the absence of ship noise was not different regardless of the length of exposure ( $p = 0.994$  at  $T_3$ ,  $0.4175$  at  $T_7$ , and  $0.635$  at  $T_{14}$ ; Fig 2B1). To gain more insight into the mechanism leading to this difference in bioaccumulation, we then turned to a comparative analysis of the oyster behavior in the presence and absence of cargo ship noise.

**Table 1. Primers used for the RT-qPCR assay.**

Genes	Functions	Primer sequences	Accession numbers	References
<i>clec1</i>	C-type lectin-1	F- GTGAGACCGGAACCTGGATTAG	AB308130.1	This study
		R- CGTTGAAGACCTGGAGCAT		
<i>drd2</i>	Dopamine receptor D2	F- GTGAGCGTGATTCTCTGGTAG	JH817851.1	This study
		R- CGAGCGACCTTAGTCAGTTT		
<i>dld</i>	Dihydrolipoyl dehydrogenase	F- GGAGCTTCCTGTGAAGACATAG	XM_020071857.1	This study
		R- CTGCATAGGCTGCCAAGTTA		
<i>cs</i>	Citrate synthase	F- ACGTCTCTGTTGCGAGTTTC	JH816386.1	This study
		R- ACGACTTGGGACGTTCAAT		
<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase	F- GCTGGAACCTGAGTTGTAGAG	XM_011435972.2	This study
		R- GCACCATTCAAGGCATCAAG		
<i>idh2</i>	Isocitrate dehydrogenase [NADP] mitochondrial	F- CCGACGGAAAGACTGTGCG	AY551096.1	[34]
		R- CTGGCTACCGGGTTTGTG		
<i>idh3a</i>	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit $\alpha$	F- GTCATGATGCTCCGCTACAT	JH816185.1	This study
		R- CAGTTAGCACCCCTCCTTCTC		
<i>tnt</i>	Titin	F- TTTGGTACTGCGGAGTTCTG	JH817834.1	This study
		R- CTCCGGCAAATGGTGTAGTAT		
<i>twf</i>	Twitchin	F- CCGAAACTCCTCCAACCTCAA	XM_020069067.1	This study
		R- TCCTCAGCAGCTATCCTATCA		
<i>cox1</i>	Cytochrome c oxidase subunit I	F- GTGCCAACTGGTATTAAGGTGT R- ACACCGCACCCATTGAT	AB033687	[35]
<i>sod2</i>	Manganese superoxide dismutase	F- ACAAGTCAATCAGTGCCCT	EU420128	[35]
		R- CCATTGCCCTCTGCCAGT		
<i>sod1</i>	Copper/Zinc superoxide dismutase	F- CCAGAGGATCACGAGAGGC	AJ496219	[36]
		R- GCGTTTCCGGTCGTCTT		
<i>cat</i>	Catalase	F- GTCGTGCCCTTTTACAACC	EF687775.1	[35]
		R- CGCCCGTCCGAAGTTT		
<i>gpx</i>	Selenium-dependent glutathione peroxidase	F- ATCGAAGCTGCAACCA	EF692639	[35]
		R- AGCTCCGTGCGATTGT		
<i>mt2</i>	Metallothionein isoform 2	F- TCCGGATGTGGCTGCAAAGTCAAG	AJ297818	[37]
		R- GGTCCCTTGTACACGCACTCATT		
<i>acac</i>	Acetyl-coA carboxylase	F- GGGCACCGTTAATGCCTAC	XM_020073360	[38]
		R- TGACTCGGGTTCATGTGTT		
<i>tgl</i>	Triacylglycerol lipase	F- ACACCCACCGTGCTTT	EE677866	[38]
		R- GTTGTCTTGAGATCCTTGATTATCAG		
<i>p53</i>	p53 gene	F- CCCTCAAAGCAGTCCCA	AM236465.2	[35]
		R- TGTAGCGATCCACCTGATT		
<i>bax</i>	BCL2 associated X	F- CCCTCAGGTGTGACCCG	XM_011426179	[38]
		R- TGCAAGCTAAGCTCTGCC		
<i>12s</i>	12S ribosomal RNA	F- CTCAGTCTTGCGGGAGG	EF484875	[35]
		R- GGTATGCGGAACCGCC		
<i>ef1<math>\alpha</math></i>	Elongation factor 1 $\alpha$	F- AGAATGGATATGCGCTGT	AB122066.1	[38]
		R- GCCACGGTCTGCCTCA		
<i>rpl7</i>	Ribosomal protein L7	F- ACACCTCGGACGCTTT	AJ557884.1	[38]
		R- GCTGTCTTACGCAGGC		
<i>gadph</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	F- CGTACCAGTCCAGATGTTTCC	CAD67717	[39]
		R- GCCTTGATGGCTGCCAATA		
<i>actb</i>	$\beta$ -actin	F- AGTACCCCATTAACACGG	AF026063	[35]
		R- TGGCGGGAGCGTTGAA		

F and R designate forward and reverse primers respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194174.t001>

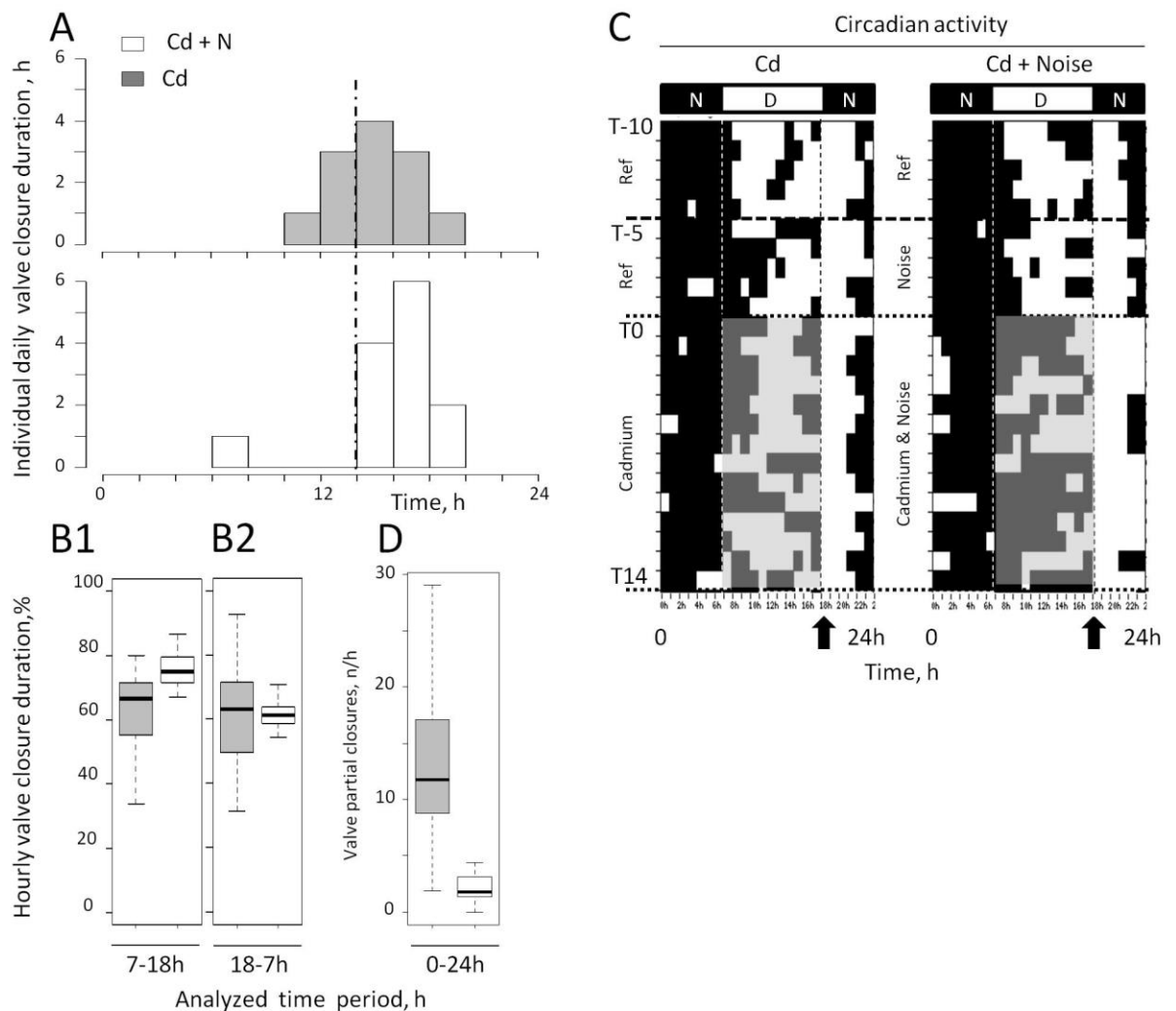


**Fig 2. The change of cadmium concentration in the gills (A, A1) and digestive glands (B, B1) in oysters *M. gigas*.** A: mean values  $\pm$  1 SE as a function of time in the gills; B, in the digestive glands. A1 and B1, Distribution of probability densities at day 0 (T0), day 3 (T3), day 7 (T7) and day 14 (T14). In the presence of cargo ship noise, the distributions were skewed to the lower values at T3, T7, and T14 in the gills and T14 in the digestive glands.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194174.g002>

### Animal behavior

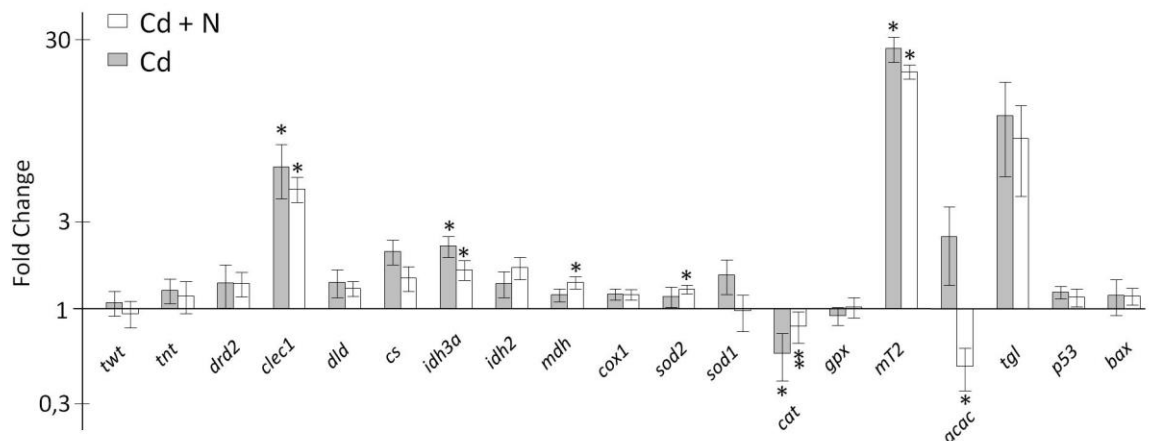
During the first hours of noise exposures at T<sub>-6</sub> and T<sub>-5</sub>, a transient valve closure, as reported in Charifi et al. [20], was observable in 100% of the animals. The response was present in 60% of the individuals after 2 days and vanished after 4 days. Fig 3A presents the distribution of the mean daily valve closure durations for oysters under the two conditions for the entire 14-day exposure period to Cd. In the presence of cargo ship noise, a shift occurred toward higher values in the most frequently observed mean hourly valve closure durations. No significant difference was observed between the mean values ( $p = 0.09764$ ) due to a single outlier ( $p = 0.0001$ ) in the group exposed to ship noise. In the absence of this outlier, the difference became significant ( $p = 0.02982$ ), which illustrates the small difference between conditions. We then compared the diurnal and nocturnal periods (Fig 3B1 and 3B2). During the diurnal period (7–18 h, active period), an increase was observed in the valve closure duration in the oysters exposed to ship noise (Fig 3B1;  $p = 0.029$ ) but not during the nocturnal period from 18–7 h (Fig 3B2;  $p = 0.857$ ). This result is also illustrated in Fig 3C, which presents the hourly circadian activity under both conditions: compare the two shaded areas comprised between T<sub>0</sub> and T<sub>14</sub> during the diurnal period. Finally, the depressant action of noise was also characterized by a drastic



**Fig 3. Behavioral changes in the presence of cargo ship noise in oysters *M. gigas* exposed to Cd.** A, Distribution of individual valve closure durations. B1, Description by quartiles of the hourly valve closure durations during the light (7-18h) and B2, dark (18-7h) periods in oysters exposed to Cd plus cargo ship noise (white) or Cd alone (gray). D, number of partial valve closures per hour. A, B1, B2, and D were calculated for the whole 14-day-exposure period; bold lines, medians. With one exception at the bottom of Fig 1A, the variability was systematically lower in the presence of cargo ship noise. C, Valve opening—closing actograms, each line represents 1 day. The white and black sections of each line represent hourly behavioral values above and below the mean behavior of the day, respectively. In the presence of cargo ship noise, the oysters are closed more during the day (light) period, gray area. The black arrows show the daily timing of the food supply, just prior the opening behavior associated with the automatic light shut-off. N = 13 oysters exposed to Cd and cargo ship noise and 12 oysters exposed to Cd alone.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194174.g003>

decrease in the valve activity measured, as shown by a decrease in the number of valve movements crossing the 80% line of maximum opening value under the Cd plus ship noise condition (Fig 3D). In the absence of ship noise, the average number of valve partial-closures per hour was approximately six times higher, and the variability was more important than in the oysters exposed to the Cd plus ship noise (min =  $0.00 \cdot h^{-1}$ ; median =  $1.80 \cdot h^{-1}$ ; max =  $4.47 \cdot h^{-1}$  under cargo-ship noise and min =  $1.94 \cdot h^{-1}$ ; median =  $11.78 \cdot h^{-1}$ ; max =  $29.00 \cdot h^{-1}$  without cargo-ship noise,  $p = 0.0003$ ).



**Fig 4. Transcriptional variations of selected genes in the gills of oysters *M. gigas* exposed to Cd plus cargo ship noise or Cd alone for 14 days.** \* and \*\* denote significant differences between the condition and the control and between experimental conditions, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194174.g004>

We then studied some consequences of the phenomenon at the genic level in the gills, as the gills exhibited a significant change in contamination, before switching to an analysis at a more global and integrative level for the comparison of growth rates.

### Gene expression in the gills

In the absence of cargo ship noise and after 14 days of exposure to Cd alone, 4 of the 19 genes were over- or under-expressed compared to the reference at  $T_0$  (*clec1*, *idh3a*, *mt2* and *cat*; Fig 4). In the presence of cargo ship noise and Cd, the expression of 7 of the 19 genes was modified (*clec1*, *idh3a*, *mdh*, *sod2*, *cat*, *mt2*, *acac*). Only one gene was differentially expressed between both conditions: *cat* ( $p = 0.045$ ). As expected, the *mt2* gene, which is a hallmark of cadmium contamination, exhibited large induction factors of 20x (with ship noise) and 27x (without ship noise). The *clec1* gene was also largely overexpressed (4.6-6x). In addition to differences between mean or median values, the variability in the gene responses was also studied to learn if the presence of cargo ship noise influenced it in a manner consistent with that observed at bioaccumulation and behavioral levels (Fig 2A1; Fig 3B1 and 3B2 and 3D). For each gene, we researched if the expression increased when [Cd]g was larger. Based on the Pearson correlation, the results in Table 2 show that it is only in the absence of ship noise for *dld*, *cs*, *idh3a*, *sod1*, *gpx* and *bax* that significant correlations are observed. The distributions of expression with and without cargo ship noise were either unchanged or skewed to the lowest values in the presence of the cargo ship noise. Levene's test demonstrated that the homogeneity of variance was different between the ship noise conditions for *mt2* ( $p = 0.0322$ ), *acac* ( $p = 0.0036$ ), and *clec1* ( $p = 0.0221$ ). The distributions of expression were smaller under the condition cadmium plus cargo ship noise (Fig 5).

### Growth rate

HFNI valvometry allows information to be recorded on the daily growth rates under various experimental and environmental conditions without the animals being handled. We therefore compared the oysters shell growth rates in the presence and absence of cargo ship noise. Fig 6A and 6B shows that the growth rate was lower in oysters exposed to frequent ship noise compared with the control group without ship noise ( $p = 0.00001$ ). At  $T_{14}$ , the mean size gain at the HFNI electrode level (growth index) reached only  $37.9 \pm 4.2 \mu\text{m}$  in the presence of cargo

Table 2. Pearson correlation of [Cd]g and gene expression in Cd and Cd+N conditions.

Cd	<i>twt</i>	<i>tnt</i>	<i>drd2</i>	<i>clec1</i>	<i>dld</i>	<i>cs</i>	<i>idh3a</i>	<i>idh2</i>	<i>mdh</i>	<i>cox1</i>
	0.02	-0.21	-0.34	-0.36	0.82	0.58	0.74	0.44	0.29	0.39
	NS	NS	NS	NS	***	*	**	NS	NS	NS
	<i>sod2</i>	<i>sod1</i>	<i>cat</i>	<i>gpx</i>	<i>mt2</i>	<i>acac</i>	<i>tgl</i>	<i>p53</i>	<i>bax</i>	
	0.45	0.6	0.47	0.62	0.14	0.31	0.42	-0.07	0.71	
NS	*	NS	*	NS	NS	NS	NS	**		
Cd+N	<i>twt</i>	<i>tnt</i>	<i>drd2</i>	<i>clec1</i>	<i>dld</i>	<i>cs</i>	<i>idh3a</i>	<i>idh2</i>	<i>mdh</i>	<i>cox1</i>
	-0.18	0.07	0.42	0.2	0.4	-0.08	0.12	0.22	-0.04	0.09
	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	<i>sod2</i>	<i>sod1</i>	<i>cat</i>	<i>gpx</i>	<i>mt2</i>	<i>acac</i>	<i>tgl</i>	<i>p53</i>	<i>bax</i>	
	0.29	-0.33	0.16	-0.1	0.35	0.26	-0.47	0.2	0.08	
NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		

NS, Not statistically significant

(\*), p<0.05

(\*\*), p<0.01

(\*\*\*), p<0.001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194174.t002>

ship noise when it was  $99.6 \pm 8.8 \mu\text{m}$  in the absence of ship noise ( $p = 0.000004$ ; Fig 6B). Moreover, starting at  $T_6$  a growth arrest was observed in the presence of cargo ship noise, as the growth indexes did not vary from  $T_6$  to  $T_{10}$  ( $p = 0.542$ ; Fig 6A). No similar trend was observed in the non-noise group.

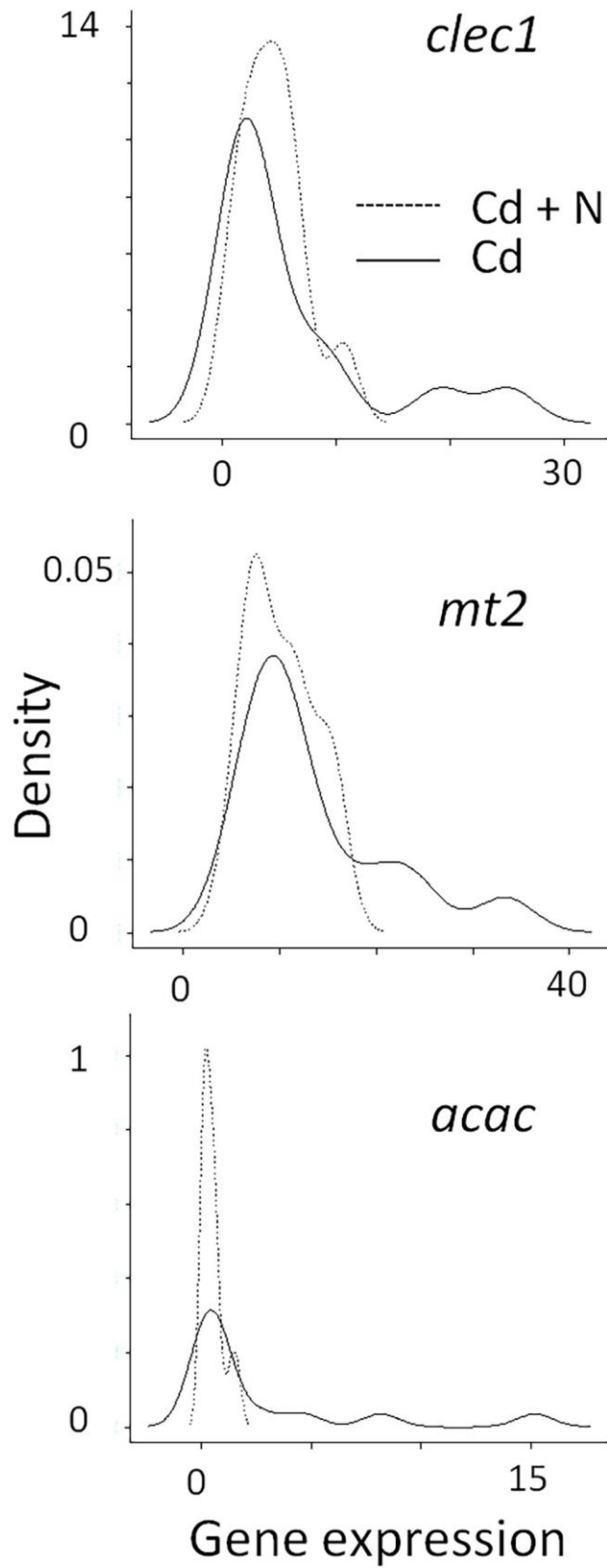
## Discussion

The influence of chronic exposure to cargo ship noise (92 ship passages/day) on metal contamination was studied in oysters during a 14-day exposure period. We compared two situations with similar concentrations of [Cd]w and food supply in the presence or absence of ship noise. We analyzed the accumulation of Cd in the gills and digestive glands, the transcriptional response of selected genes in gills, the valve behaviors, and the growth rates. Based on previous works, cadmium was taken as both a toxicant and an indirect marker of ventilatory activity. The whole data set illustrated the power of noise as a physiological drive and suggested a depressant effect characterized by a decrease of valve opening duration, valve activity, ventilatory activity and growth rate. The associated ecotoxicological impact was a decreased Cd bioaccumulation in the gills and a modulation of transcriptional expression of some genes. Indeed, *mt2*, *clec1*, and *acac* exhibited the largest changes. Finally, an analysis of variance for the whole data set (Cd concentrations in gills and digestive gland, valve closure durations, number of partial valve closure, gene, and growth rate) showed that variance frequently decreased in the presence of cargo ship noise with most individual data skewed to the lower range.

## Impact of noise on ventilatory activity

Few studies have reported the effect of anthropogenic noise on the ventilatory activity in marine animals. Bruintjes et al. [41] recorded transient hyperventilation in juvenile European eels (*Anguilla anguilla*) and the juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*) when exposed to a short noise stimulus (eel: ship noise for 2 min at 139.3–141.2 dBrms re 1  $\mu\text{Pa}$ ; seabass, pile driving for 2 min, 165–167 dB re 1  $\mu\text{Pa}$  at peak level). The hyperventilation rapidly dissipated (within 2 min) after exposure in the seabass, and the recovery was partial in the



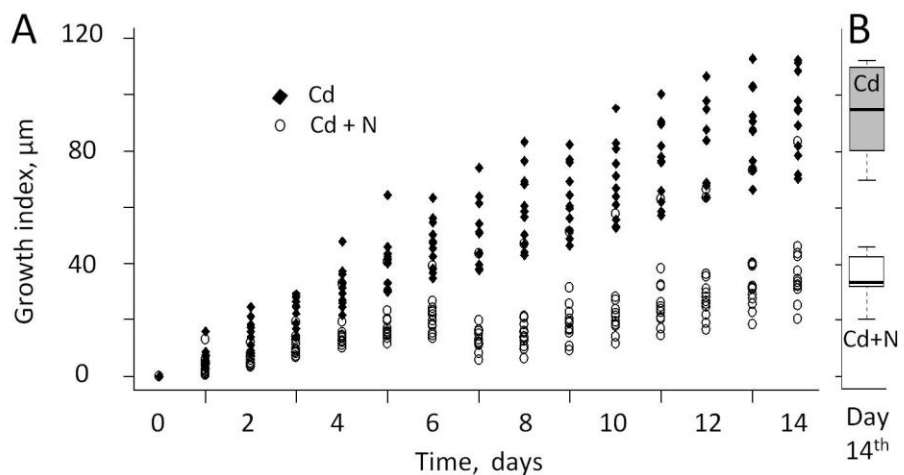


**Fig 5. Distribution of the probability densities of gene expression in three genes exhibiting a different variance at day 14.** In the presence of cargo ship noise (Cd + N), the distributions were skewed to the lower values in comparison to the distribution in the absence of the ship noise (Cd).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194174.g005>

European eels. In crustaceans, Wale et al. [42] reported that crabs *Carcinus maenas* exposed to a single, ship-noise playback every 2 days over 15 days (148–150 dBrms re 1  $\mu$ Pa, duration 7.5 min) exhibited a reproducible increase in oxygen consumption without acclimation with time. Radford et al. [43] conducted an experiment over 12 weeks. They showed that naive fish hyperventilated when exposed to a single impulsive noise but not when exposed to repetitive stimulation. It fits well with the present study as oysters exhibited a transient decrease in their valve opening amplitudes—similar to that described by Charifi et al. [20]—only at the beginning of the test period. It faded over time to vanish after 4 days. The ventilation, defined as the volume of water ventilated per unit of time, was not directly measured in this report because it required handling, and we did not want to interfere with the animal’s resting behavior. Instead, we used the Cd bioaccumulation as a proxy because in water breathers that were maintained at a constant [Cd]<sub>w</sub>, an increase in ventilatory activity has been demonstrated to increase the Cd accumulation and vice versa (see Introduction). In the present experiment, possibly the oysters exhibited a transient hyperventilation at the onset of the cargo ship noise exposure but the bulk of evidence shows that they ventilated less during most of the 14-day exposure period (see Fig 3).

Oysters unexposed to ship noise presented a larger interindividual distribution of [Cd]<sub>g</sub>, with more contaminated animals. As reported by Pan et al. [44] in the scallop *Chlamys nobilis*, such an intraspecific variability is routinely observed in metal bioaccumulation for individuals of the same size and collected at the same location and period. This is also similar to the PSP toxin accumulation observed in oysters *M. gigas* exposed to the toxic algae *Alexandrium minutum*: contamination in numerous animals remains in the low range of the global distribution data, whereas a minority accumulated the largest amounts [45,46]. Fernandez et al. [47] proposed that this interindividual difference could be due to physiological differences in the feeding performances, digestion rate, and excretion costs. Haberkorn et al. [45] demonstrated that



**Fig 6. Growth rate index in oysters *M. gigas* in the presence of cadmium with (Cd + N) or without (Cd) cargo ship noise.** A, daily change of growth rate index. B, description by quartiles of the difference between growth index at day 14. The growth rate is smaller in presence of cargo ship noise. N = 13 oysters exposed to Cd and cargo ship noise and 12 oysters exposed to Cd alone.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194174.g006>

the interindividual variability of PSP bioaccumulation in *M. gigas* was positively correlated to the opening duration during the exposure period.

In the present work, significant behavioral changes were observed between the two conditions during the 14 days of exposure. Oysters exposed to cargo ship noise spent more time closed compared to the animals not exposed to ship noise. The difference was concentrated during their active period, which was the day time. In addition, oysters not exposed to ship noise exhibited a higher number of partial-closures than those exposed to ship noise. Partial-closures are partial valve openings and closings that are associated with the back and forth movements of bulk water, which replenishes the water in the pallial cavity. The physiological role of the valve must be taken into consideration. Indeed, the strategy developed by water breathers to ensure their ventilatory activity has been summarized by Massabuau and Abele [48]. The basic idea is that ventilation is a limiting step. The branchial cavity, herein referred to as the pallial cavity, must be viewed as an antechamber in which the water renewal is controlled and slowed when compared to the bulk water. The consequence is that the gills, and the blood inside, face a relatively confined milieu that receives low oxygenation and is hypercapnic. In bivalve mollusks, a decreased quantity and/or amplitude of these partial closures would maintain lower Cd concentrations in the pallial cavity, and under such conditions, a metal concentration gradient will develop in the boundary layer between the gill surface and the bulk-inspired water. Consequently, a decreased diffusion rate from the bulk water to the hemolymph should exist in the gills, limiting the contamination process. Therefore, we propose that, in presence of cargo ship noise, as the valve-opening duration decreased during the daytime and the number of partial-closures also decreased, the gills should be less irrigated by bulk water and thus less exposed to metal uptake. In addition, the excreted metabolic CO<sub>2</sub> should build up in the branchial cavity, leading to an acidification of water pH in the boundary layers [49,50]. The Free-Ion Activity Model and the Biotic Ligand Model [51,52], which were proposed to predict how free metals interact with external biological membranes, suggest less cadmium uptake and toxicity. However, a prediction is rather difficult, as the problem the oysters face is a balance between more free ions and competition in the gills between the Cd<sup>++</sup> and H<sup>+</sup> for binding sites [53]. These ideas were discussed by Campbell [26] to explain how hypoxia and the associated hyperventilation might increase metal contamination in water breathers. We propose to apply them to the present situation and to the analysis of physiological mechanisms explaining the impact of ship noise at larger scale.

### Gene expression

Few studies have reported an induction of oxidative stress under noise exposure. In mice, Cheng et al. [54] observed an increase in the oxidative stress in the encephalic region associated with the lemniscal ascending pathway after they exposed animals to 80 dB re 20 μPa sound for 2 h/day for 6 weeks. Samson et al. [55] also reported a significant effect of noise exposure on free radical scavenging enzymes in the brain of white strain male albino rats. Exposed to acute or chronic white noise at 100 dB re 20 μPa sound for a period of 4 h per day, the animals showed a significant increase in their levels of antioxidant enzymes. The present work also suggests the existence of an oxidative stress under the condition cadmium plus ship noise as an upregulation of *sod2* and *mdh* are reported. Shi and Gibson [56] already shown that oxidative stress can induce an increase in *mdh* gene expression. Without ship noise, and in the presence of Cd alone, the expression of *sod2*, *sod1*, *gpx*, and *mdh* did not change. Cadmium does not directly induce ROS production [57], but it can induce oxidative stress indirectly through different pathways [58]. The absence of enhancement of the oxidative stress defense mechanism at T<sub>14</sub> in presence of Cd alone suggests either weak oxidative stress or an

already fixed problem. In this view, the data show that the *cat* gene coding for the catalase, an enzyme responsible for converting  $\text{H}_2\text{O}_2$  to  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{O}_2$ , was downregulated more with Cd alone than with Cd plus the cargo ship noise. This larger downregulation agrees with the above dataset, which fits well with a low or absent oxidative stress and higher MT proteins levels in the cells. However, an alternative explanation is that *cat* could also be downregulated through a direct action of Cd [59,60]. Pierron et al. [28] reported a repression of the *cat* gene in the gills of the glass eel (*Anguilla anguilla*) exposed to  $[\text{Cd}]_w$   $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  during 14 days in brackish water (salinity 0.2 ‰).

Metallothioneins (MT), proteins with a high affinity to metal ions, are considered to play an important role intracellularly in controlling the bioavailability of essential metals and in the protection against the toxicity of nonessential metals, participating in their detoxification. Cadmium is one of the strongest inducers of *mt* gene expression [61]. The accumulation of cadmium in the gills of oysters under both conditions induced a significant overexpression of the *mt2* gene, with significant induction factors (20–27). However, no correlation was observed when a paired analysis of the cadmium concentrations and *mt2* gene expression levels were studied under both conditions. The latter is in accordance with the result obtained by Gonzalez et al. [62] for the zebrafish *Danio rerio* exposed to  $[\text{Cd}]_w = 1.9$  and  $9.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

The comparison we report between the expression of *mt2* in the presence or absence of cargo ship noise showed that the median distributions of *mt2* expression were not significantly different (Kruskall-Wallis test) but that the variances were different (Levene test). The latter was due to an absence of the higher expression values in the presence of cargo ship noise. The expression of acetyl-coA carboxylase, used to synthesize fatty acids, showed the same pattern of distribution, with all values skewed to the left (Fig 5). Otherwise, Fig 4 shows an under-expression of acetyl-coA carboxylase in the presence of ship noise, indicating a decrease in fatty acid synthesis and lipogenesis. Triglyceride lipase did not change, indicating an absence of enhanced lipolysis. We argue in this work that cargo ship noise exposure would have a depressant impact on the physiology and activity of oysters. The need for energy production is expected to decrease in such a situation, which is in accordance with a decreased expression of acetyl-CoA carboxylase. Food particle sorting in suspension-feeding bivalves is partly based on a recognition mechanism mediated by the lectins contained in the gill mucus [63]. Homolog of these lectins was identified in *M. gigas* (*clec1*) and their highest expressions were not observed in the presence of cargo ship noise but only with cadmium and without ship noise (Fig 5). A lower need for that protein in oysters exposed ship noise correlated to a lower feeding activity is suggested. To summarize this paragraph, the presence of ship noise in addition to cadmium brings some oxidative stress, a lower feeding activity, a decrease of fatty acid synthesis, lipogenesis and lectin synthesis, in comparison to the condition without cargo ship noise. Taken together, these findings fit well with the depressant effect shown by the behavioral analysis and the decrease in growth rate.

### Growth rate

One of the prominent effects of anthropogenic noise exposure is the impact on the growth rate. Oysters exposed to noise showed a low rate of growth compared to oysters without cargo ship noise. Under ambient noise, oysters presented an averaged index of shell growth by approximately 60% in comparison to their congeners. Importantly, this difference cannot be directly attributed to Cd because the oysters that are growing more quickly are also those that are more contaminated. Lagardère [64] observed the same effect of noise on the brown shrimp *Crangon crangon*. Shrimp reared in tanks with a noise level of 30 dB higher than the controls and in a frequency range of 80 to 400 Hz, exhibited a significant reduction in growth. In the

present experiment, the growth slow down measured in oysters exposed to cargo ship noise may be partly explained by a reduction in food intake, as their valves were open less often, and the bulk of evidence suggest that the oysters hypoventilated.

## Conclusion

Present data show a depressant action of cargo ship noise on oyster *M. gigas* valve opening duration, valve activity, and ventilation, as well as disturbances in fat metabolism. It will be of greatest interest to complete it with more results obtained at diverse sound pressure intensities, during longer times of exposure and by means of field research. But as they stand the data confirm previous reports on a decrease in invertebrate activity and show an unexpected result in terms of metal bioaccumulation processes and growth rates. Cargo ship noise exposure limits Cd contamination and is associated with a slowdown in growth, unraveling a potentially massive risk in terms of ecosystem productivity.

## Supporting information

**S1 File. Cargo noise sample from Santander port (WAV).**  
(WAV)

**S1 Database. All data base.**  
(XLSX)

## Acknowledgments

The authors wish to thank Prof. Peter Campbell for helpful discussions, Régine Maury-Brachet, Pierre-Yves Gourves, Adeline Arini for the cadmium analysis and Bruno Etcheverria for the animal care.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Mohcine Charifi, Alison Miserazzi, Jean-Charles Massabuau.

**Data curation:** Mohcine Charifi, Alison Miserazzi, Mohamedou Sow, Mickael Perrigault, Patrice Gonzalez, Jean-Charles Massabuau.

**Formal analysis:** Mohcine Charifi, Alison Miserazzi, Mohamedou Sow, Mickael Perrigault, Patrice Gonzalez, Jean-Charles Massabuau.

**Funding acquisition:** Soumaya Benomar, Jean-Charles Massabuau.

**Investigation:** Mohcine Charifi, Alison Miserazzi, Jean-Charles Massabuau.

**Methodology:** Mohcine Charifi, Alison Miserazzi, Mickael Perrigault, Pierre Ciret, Jean-Charles Massabuau.

**Project administration:** Soumaya Benomar, Jean-Charles Massabuau.

**Resources:** Soumaya Benomar, Jean-Charles Massabuau.

**Software:** Mohamedou Sow.

**Supervision:** Mohamedou Sow, Mickael Perrigault, Patrice Gonzalez, Pierre Ciret, Soumaya Benomar, Jean-Charles Massabuau.

**Validation:** Mohcine Charifi, Alison Miserazzi, Mohamedou Sow, Mickael Perrigault, Patrice Gonzalez, Pierre Ciret, Jean-Charles Massabuau.

**Visualization:** Mohcine Charifi, Alison Miserazzi, Mohamedou Sow, Jean-Charles Massabuau.

**Writing – original draft:** Mohcine Charifi, Alison Miserazzi, Mohamedou Sow, Mickael Perigault, Patrice Gonzalez, Jean-Charles Massabuau.

**Writing – review & editing:** Mohcine Charifi, Alison Miserazzi, Jean-Charles Massabuau.

## References

1. Rogers PH, Cox M. Underwater sound as a biological stimulus. In: Atema J, Fay RR, Popper AN, Tavolga WN, editors. *Sensory Biology of Aquatic Animals*. New York, NY: Springer New York; 1988. pp. 131–149. Available: [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3714-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3714-3_5)
2. Myrberg AA, Mohler M, Catala JD. Sound production by males of a coral reef fish (*Pomacentrus partitus*): its significance to females. *Anim Behav*. 1986; 34: 913–923. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(86\)80077-X](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(86)80077-X)
3. Gannon DP, Barros NB, Nowacek DP, Read AJ, Waples DM, Wells RS. Prey detection by bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*: an experimental test of the passive listening hypothesis. *Anim Behav*. 2005; 69: 709–720. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.06.020>
4. Amorim MCP, Neves ASM. Male painted gobies (*Pomatoschistus pictus*) vocalise to defend territories. *Behaviour*. 2008; 145: 1065–1083.
5. Lillis A, Eggleston DB, Bohnenstiehl DR. Oyster larvae settle in response to habitat-associated underwater sounds. *PloS One*. 2013; 8: e79337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079337> PMID: 24205381
6. Frisk GV. Noiseconomics: The relationship between ambient noise levels in the sea and global economic trends. *Sci Rep*. 2012; 2: 437. <https://doi.org/10.1038/srep00437> PMID: 22666540
7. McDonald MA, Hildebrand JA, Wiggins SM. Increases in deep ocean ambient noise in the Northeast Pacific west of San Nicolas Island, California. *J Acoust Soc Am*. 2006; 120: 711–718. PMID: 16938959
8. Ross D. On Ocean Underwater Ambient Noise. *Inst Acoust Bull*. 1993; 18: 5–8.
9. Ross D. Ship sources of ambient noise. *IEEE J Ocean Eng*. 2005; 30: 257–261. <https://doi.org/10.1109/JOE.2005.850879>
10. Peng C, Zhao X, Liu G. Noise in the sea and its impacts on marine organisms. *Int J Environ Res Public Health*. 2015; 12: 12304–12323. <https://doi.org/10.3390/ijerph121012304> PMID: 26437424
11. Hawkins AD, Pembroke AE, Popper AN. Information gaps in understanding the effects of noise on fishes and invertebrates. *Rev Fish Biol Fish*. 2015; 25: 39–64. <https://doi.org/10.1007/s11160-014-9369-3>
12. Fewtrell JL, McCauley RD. Impact of air gun noise on the behaviour of marine fish and squid. *Mar Pollut Bull*. 2012; 64: 984–993. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.02.009> PMID: 22385754
13. André M, Solé M, Lenoir M, Durfort M, Quero C, Mas A, et al. Low-frequency sounds induce acoustic trauma in cephalopods. *Front Ecol Environ*. 2011; 9: 489–493. <https://doi.org/10.1890/100124>
14. Guerra Á, González ÁF, Pascual S, Dawe EG. The giant squid *Architeuthis*: An emblematic invertebrate that can represent concern for the conservation of marine biodiversity. *Biol Conserv*. 2011; 144: 1989–1997. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.04.021>
15. Mosher JL. The responses of *Macoma balthica* (Bivalvia) to vibrations. *J Molluscan Stud*. 1972; 40: 125–131. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.mollus.a065209>
16. Ellers O. Discrimination among wave-generated sounds by a swash-riding clam. *Biol Bull*. 1995; 189: 128–137. <https://doi.org/10.2307/1542463> PMID: 27768488
17. Roberts L, Cheesman S, Breithaupt T, Elliott M. Sensitivity of the mussel *Mytilus edulis* to substrate-borne vibration in relation to anthropogenically generated noise. *Mar Ecol Prog Ser*. 2015; 538: 185–195.
18. Solan M, Hauton C, Godbold JA, Wood CL, Leighton TG, White P. Anthropogenic sources of underwater sound can modify how sediment-dwelling invertebrates mediate ecosystem properties. *Sci Rep*. 2016; 6: 20540. <https://doi.org/10.1038/srep20540> PMID: 26847483
19. Peng C, Zhao X, Liu S, Shi W, Han Y, Guo C, et al. Effects of anthropogenic sound on digging behavior, metabolism, Ca(2+)/Mg(2+) ATPase activity, and metabolism-related gene expression of the bivalve *Simonovacula constricta*. *Sci Rep*. 2016; 6: 24266. <https://doi.org/10.1038/srep24266> PMID: 27063002

20. Charifi M, Sow M, Ciret P, Benomar S, Massabuau J-C. The sense of hearing in the Pacific oyster, *Magallana gigas*. PloS One. 2017; 12: e0185353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185353> PMID: [29069092](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29069092/)
21. Andrade H, Massabuau J-C, Cochrane S, Ciret P, Tran D, Sow M, et al. High frequency non-invasive (HFNI) bio-sensors as a potential tool for marine monitoring and assessments. Front Mar Sci. 2016; 3: 187. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00187>
22. Lloyd R. Effect of dissolved oxygen concentrations on the toxicity of several poisons to rainbow trout (*Salmo Gairdnerii Richardson*). J Exp Biol. 1961; 38: 447.
23. Lloyd R, Herbert DWM. The effect of the environment on the toxicity of poisons to fish. Inst Public Health Eng J. 1962; 61: 132–145.
24. Tran D, Boudou A, Massabuau JC. How water oxygenation level influences cadmium accumulation pattern in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: a laboratory and field study. Environ Toxicol Chem. 2001; 20: 2073–2080. PMID: [11521837](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11521837/)
25. Tran D, Boudou A, Massabuau J-C. Relationship between feeding-induced ventilatory activity and bioaccumulation of dissolved and algal-bound cadmium in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. Environ Toxicol Chem. 2002; 21: 327–333. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210214> PMID: [11833801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11833801/)
26. Campbell P. How might hypoxia affect metal speciation, accumulation and toxicity—some speculation. Proceedings Seventh International Symposium on Fish Physiology, Toxicology, and Water Quality. Tallinn, Estonia; 2003. pp. 125–147.
27. Fournier E, Adam C, Massabuau J-C, Garnier-Laplace J. Selenium bioaccumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* and subsequent transfer to *Corbicula fluminea*: role of selenium speciation and bivalve ventilation. Environ Toxicol Chem. 2006; 25: 2692–2699. PMID: [17022410](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17022410/)
28. Pierron F, Baudrimont M, Boudou A, Massabuau J-C. Effects of salinity and hypoxia on cadmium bioaccumulation in the shrimp *Palaemon longirostris*. Environ Toxicol Chem. 2007; 26: 1010–1017. PMID: [17523247](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17523247/)
29. Akamatsu T, Okumura T, Novarini N, Yan HY. Empirical refinements applicable to the recording of fish sounds in small tanks. J Acoust Soc Am. 2002; 112: 3073–3082. PMID: [12509030](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12509030/)
30. Massabuau JC. From low arterial- to low tissue-oxygenation strategy. An evolutionary theory. Respir Physiol. 2001; 128: 249–261. PMID: [11718757](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11718757/)
31. Rogers PH, Hawkins AD, Popper AN, Fay RR, Gray MD. Parvulescu revisited: Small tank acoustics for bioacousticians. Adv Exp Med Biol. 2016; 875: 933–941. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2981-8\\_115](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2981-8_115) PMID: [26611052](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26611052/)
32. Schwartzmann C, Durrieu G, Sow M, Ciret P, Lazareth CE, Massabuau J-C. *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. 2011; 56: 1940–1951. <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.5.1940>
33. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. Methods San Diego Calif. 2001; 25: 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262> PMID: [11846609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/)
34. Huvet A, Herpin A, Dégremont L, Labreuche Y, Samain J-F, Cunningham C. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. Gene. 2004; 343: 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.09.008> PMID: [15563847](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15563847/)
35. Mai H, Gonzalez P, Pardon P, Tapie N, Budzinski H, Cachot J, et al. Comparative responses of sperm cells and embryos of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to exposure to metolachlor and its degradation products. Aquat Toxicol Amst Neth. 2014; 147: 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.024> PMID: [24378469](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24378469/)
36. Bijoux H. Study of the Arcachon Bay's chemical contaminants' toxic impact on the cupped oyster *Crassostrea gigas*: in situ and experimental approach. PhD thesis, Université de Bordeaux. 2014.
37. Marie V, Gonzalez P, Baudrimont M, Boutet I, Moraga D, Bourdineaud J-P, et al. Metallothionein gene expression and protein levels in triploid and diploid oysters *Crassostrea gigas* after exposure to cadmium and zinc. Environ Toxicol Chem. 2006; 25: 412–418. PMID: [16519301](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16519301/)
38. Gamain P. Impact of pollutants and climate change stressors on reproduction capacity and embryo-larval development of the oyster *Crassostrea gigas* in the Arcachon bay. PhD thesis, Université de Bordeaux. 2016.
39. Payton L, Perrigault M, Bourdineaud J-P, Marcel A, Massabuau J-C, Tran D. Trojan horse strategy for non-invasive interference of clock gene in the oyster *Crassostrea gigas*. Mar Biotechnol N Y N. 2017; 19: 361–371. <https://doi.org/10.1007/s10126-017-9761-9> PMID: [28674930](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28674930/)

40. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for statistical computing [Internet]. Vienna, Austria; 2017. Available: <https://www.R-project.org/>
41. Brintjes R, Purser J, Everley KA, Mangan S, Simpson SD, Radford AN. Rapid recovery following short-term acoustic disturbance in two fish species. *R Soc Open Sci.* 2016; 3. <https://doi.org/10.1098/rsos.150686> PMID: 26909193
42. Wale MA, Simpson SD, Radford AN. Size-dependent physiological responses of shore crabs to single and repeated playback of ship noise. *Biol Lett.* 2013; 9: 20121194. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.1194> PMID: 23445945
43. Radford AN, Lèbre L, Lecaillon G, Nedelec SL, Simpson SD. Repeated exposure reduces the response to impulsive noise in European seabass. *Glob Change Biol.* 2016; 22: 3349–3360. <https://doi.org/10.1111/gcb.13352> PMID: 27282635
44. Pan K, Wang W-X. The subcellular fate of cadmium and zinc in the scallop *Chlamys nobilis* during waterborne and dietary metal exposure. *Aquat Toxicol Amst Neth.* 2008; 90: 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.09.010> PMID: 18992948
45. Haberkorn H, Tran D, Massabuau J-C, Ciret P, Savar V, Soudant P. 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.* 2011; 62: 1191–1197. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.03.034> PMID: 21511307
46. Lassus P, Amzil Z, Baron R, Sechet V, Barille L, Abadie E, et al. Modelling the accumulation of PSP toxins in Thau Lagoon oysters (*Crassostrea gigas*) from trials using mixed cultures of *Alexandrium catenella* and *Thalassiosira weissflogii*. *Aquat Living Resour.* 2007; 20: 59–67. <https://doi.org/10.1051/alr:2007016>
47. Fernández-Reiriz MJ, Irisarri J, Labarta U. Flexibility of physiological traits underlying inter-individual growth differences in intertidal and subtidal mussels *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One.* 2016; 11: e0148245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148245> PMID: 26849372
48. Massabuau JC, Abele D. Principles of oxygen uptake and tissue oxygenation in water-breathing animals. *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems.* John Wiley & Sons, Ltd; 2011. pp. 139–156.
49. Burtin B. Etude du rôle de la composition ionique de l'eau dans la régulation de l'état acide-base extracellulaire chez l'écrevisse. PhD thesis, Université Louis Pasteur, Strasbourg. 1986.
50. Randall D, Lin H, Wright PA. Gill water flow and the chemistry of the boundary layer. *Physiol Zool.* 1991; 64: 26–38.
51. Di Toro DM, Allen HE, Bergman HL, Meyer JS, Paquin PR, Santore RC. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ Toxicol Chem.* 2001; 20: 2383–2396. PMID: 11596774
52. Gorsuch JW, Janssen CR, Lee CM, Reiley MC. Special issue: The biotic ligand model for metals—current research, future directions, regulatory implications. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol.* 2002; 133: 1–343.
53. Campbel PGC, Stokes PM. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Can J Fish Aquat Sci.* 1985; 42: 2034–2049. <https://doi.org/10.1139/f85-251>
54. Cheng L, Wang S-H, Chen Q-C, Liao X-M. Moderate noise induced cognition impairment of mice and its underlying mechanisms. *Physiol Behav.* 2011; 104: 981–988. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.06.018> PMID: 21726571
55. Samson J, Sheela Devi R, Ravindran R, Senthilvelan M. Effect of noise stress on free radical scavenging enzymes in brain. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2005; 20: 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.12.059> PMID: 21783581
56. Shi Q, Gibson GE. Up-regulation of the mitochondrial malate dehydrogenase by oxidative stress is mediated by miR-743a. *J Neurochem.* 2011; 118: 440–448. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07333.x> PMID: 21623795
57. Cuyppers A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen H, et al. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med.* 2010; 23: 927–940. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9329-x> PMID: 20361350
58. Thevenod F. Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 238: 221–239. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.01.013> PMID: 19371614
59. Palace VP, Majewski HS, Klaverkamp JF. Interactions among antioxidant defenses in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cadmium. *Can J Fish Aquat Sci.* 1993; 50: 156–162. <https://doi.org/10.1139/f93-018>
60. Roméo Bennani, Gnassia-Barelli, Lafaurie Girard. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat Toxicol Amst Neth.* 2000; 48: 185–194.



61. Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999; 39: 267–294. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.267> PMID: [10331085](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10331085/)
62. Gonzalez P, Baudrimont M, Boudou A, Bourdineaud J-P. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med.* 2006; 19: 225–235. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-5670-x> PMID: [16799861](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16799861/)
63. Pales Espinosa E, Koller A, Allam B. Proteomic characterization of mucosal secretions in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J Proteomics.* 2016; 132: 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.11.018> PMID: [26612663](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26612663/)
64. Lagardère JP. Effects of noise on growth and reproduction of *Crangon crangon* in rearing tanks. *Mar Biol.* 1982; 71: 177–185. <https://doi.org/10.1007/BF00394627>

### 4.3 Conclusions du chapitre

Le but de cette étude était de mieux appréhender les effets de la pollution sonore chez les bivalves, en utilisant le cadmium comme marqueur indirect de l'activité ventilatoire dans un milieu non limité en nourriture. Pour ce faire, des huitres ont été exposées au Cd seul et au Cd plus pollution sonore durant 14 jours. La concentration en Cd a été maintenue constante durant l'intégralité de l'expérimentation. La pollution sonore a été réalisée avec des passages de cargos répétés 92 fois par jour de façon aléatoire sur une période de 72 h et avec deux intensités sonores différentes. Ce choix se veut représentatif d'un port marchand « actif » qui pourrait par exemple se trouver à proximité d'une raffinerie. L'ensemble des résultats obtenus montre un effet dépresseur de la pollution sonore chez les huitres exposées. Plus précisément, en comparaison des huitres exposées au Cd seul, on observe chez les huitres exposées au Cd plus pollution sonore, une diminution du taux de croissance, une diminution de l'activité ventilatoire mise en évidence par la moindre accumulation du Cd dans les branchies, une diminution de l'activité valvaire ainsi qu'une perturbation de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras. Tous ces éléments indiquent que les huitres ont été moins actives, ont moins ventilé, se sont donc moins nourries et ont donc moins grandi en présence de pollution sonore. Cette étude a été publiée en 2018. Ces résultats ont été confirmés en 2019 par Shi et al. chez une autre espèce de bivalve, la palourde *Tegillarca granosa*, qu'ils ont exposés durant 10 jours à un bruit continu et monotone d'intensité comparable, en présence de Cd.

Au vu de ces résultats, la pertinence de l'étude du perturbateur pollution sonore dans le cadre du sujet principal de la thèse est donc largement confirmée. Dans le chapitre suivant, la palourde d'eau douce *C. fluminea* a été exposée, avec ou sans pétrole brut, à un même passage de cargo mais dans un contexte semi-naturel et avec une fréquence comprise entre 4 et 7 passages de cargo par jour uniquement. L'huitre a été exposée, avec ou sans pétrole, à la pollution sonore suivant le même protocole que celui utilisé dans ce chapitre. Ainsi, nous verrons si la pollution sonore peut être un facteur potentiellement confondant en présence de pétrole brut et si ses effets tendent à être reproductibles au travers de différentes configurations et protocoles expérimentaux.



# CHAPITRE 5

PERTURBATIONS COMPORTEMENTALES  
ET CONTAMINATION CHEZ DEUX  
MOLLUSQUES BIVALVES EXPOSES AU  
PETROLE BRUT DANS UN CONTEXTE  
MONO ET MULTISTRESS



## 5.1 Introduction

Au cours de ces travaux de thèse, un des principaux objectifs était d'étudier la réponse comportementale de mollusques bivalves exposés au pétrole brut seul et dans un contexte multistress réaliste. Le but dans cette partie était d'identifier si, en présence d'autres facteurs de stress, une réponse comportementale au pétrole brut était fiable et discernable. Pour ce faire, deux séries d'expérimentations ont été réalisées. Ces expériences sont complémentaires car elles ont été réalisées l'une en eau douce, l'autre en eau de mer chez deux espèces différentes, la palourde *C. fluminea* et l'huître *M. gigas*.

Les expériences en eau douce ont été faites dans un contexte proche du milieu naturel, au sein de rivières artificielles extérieures soumises aux variations météorologiques et alimentées en continu par l'eau du Gave de Pau (Pyrénées-Atlantiques, France). Les expériences en eau de mer ont été réalisées à l'intérieur de la Station Marine d'Arcachon en conditions simplifiées mais contrôlées.

Dans les rivières artificielles, les palourdes ont été exposées pendant 10 jours, dans 8 cours d'eau indépendants les uns des autres, au pétrole brut seul, au pétrole brut et au baryum, au pétrole brut et à la pollution sonore, au pétrole brut et à des pulses de turbidité, ou au baryum seul, à la pollution sonore seule, aux pulses de turbidité seuls. L'ensemble des facteurs de stress et leurs concentrations ou pressions ont été choisis pour être écologiquement réalistes. Pour le baryum, le choix a été fait à partir de résultats mesurés dans des panaches de dilution d'eau de production à l'aval de plateformes pétrolières (TOTAL, communication personnelle). Pour la turbidité, nous avons fait le choix de bouffées et de concentrations mesurées en rivière. Pour la pollution sonore, nous sommes partis sur l'idée d'un quai fréquenté par des cargos de tonnage moyen. Ce travail a fait l'objet d'un article (Miserazzi et al., 2020a) et constitue la première partie des résultats de ce chapitre (§ 5.2).

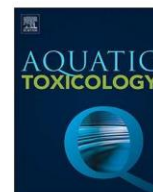
Dans la partie suivante (§ 5.3), nous aborderons la réponse comportementale d'une autre espèce de bivalve, l'huître *M. gigas*, en milieu marin. Cette étude, qui a été réalisée en conditions contrôlées de laboratoire, a permis de complexifier l'exposition des huîtres au pétrole brut et d'étudier des concentrations plus élevées. Au lieu de maintenir une concentration constante et figée, nous avons choisi d'exposer les huîtres à une concentration

variable au cours du temps afin de pouvoir suivre l'évolution de leur comportement. Nous avons posé deux questions principales. La réponse comportementale de l'huitre est-elle toujours la même ou évolue-t-elle en fonction de la concentration appliquée ? Cette réponse est-elle cohérente avec celle mise en évidence en eau douce avec les corbicules ? En conditions multistress, nous avons travaillé avec une hypoxie très forte mais néanmoins réaliste, puisque correspondant à des valeurs mesurées près du fond au niveau de plateformes dans le Golfe Arabo-Persique (TOTAL, communications personnelles), et avec une pollution sonore également relativement importante.

En ce qui concerne plus précisément la pollution sonore, nous verrons dans l'article qui suit chez *C. fluminea* (§ 5.2) que nous n'avons pas mis en évidence de perturbation chez les corbicules exposés à 4 – 7 passages de cargos par jour. Ce résultat pouvait apparaître en contradiction avec le chapitre précédent (Chapitre 4) montrant un impact comportemental et physiologique chez l'huitre avec une fréquence de 92 passages de cargos par jour. Les différences sont-elles liées à la dose ou est-ce que les réponses des bivalves à la pollution sonore sont variables et peu reproductibles ? Pour répondre à cette sous-question, le même protocole d'exposition des huitres à la pollution sonore (celui présenté dans le Chapitre 4 ; Charifi et al., 2018 ; 92 passages de cargos par jour) a donc été repris dans la § 5.3.

## **5.2 Article: Asiatic clam *Corbicula fluminea* exhibits distinguishable behavioural responses to crude oil under semi-natural multiple stress conditions**

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105381>



## Asiatic clam *Corbicula fluminea* exhibits distinguishable behavioural responses to crude oil under semi-natural multiple stress conditions

A. Miserazzi<sup>a,b</sup>, M. Sow<sup>a,b</sup>, C. Gelber<sup>c</sup>, M. Charifi<sup>a,b</sup>, P. Ciret<sup>a,b</sup>, J.M. Dalens<sup>c</sup>, C. Weber<sup>c</sup>, S. Le Floch<sup>d</sup>, C. Lacroix<sup>d</sup>, P. Blanc<sup>e</sup>, J.C. Massabuau<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> University of Bordeaux, EPOC, UMR 5805, Arcachon, France

<sup>b</sup> CNRS, EPOC, UMR 5805, Talence, France

<sup>c</sup> Pôles d'études et de Recherche de Lacq, TOTAL, Lacq, France

<sup>d</sup> CEDRE, Brest, France

<sup>e</sup> CSTJF, TOTAL SA, Pau, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Bivalve mollusks  
Biomonitoring  
Crude oil  
Outdoor mesocosm  
PAH  
HFNI valvometry

### ABSTRACT

Aquatic ecosystems are subject to many anthropogenic disturbances, and understanding their possible impacts is a real challenge. Developing approaches based on the behaviour of bivalve mollusks, an integrating marker of the state of the organisms, and therefore of their environment, is relevant, whether within a natural ecosystem or an ecosystem subject to industrial activities. The main objective of this study was to identify by HFNI Valvometry a reliable and reproducible clam behavioural response in the presence of crude oil in a multistress context. To closely replicate actual field conditions, *Corbicula fluminea* was exposed in outdoor artificial streams that were subject to natural variations and were continuously fed by fresh water from the Gave de Pau (S.W. France). After a period of 26 days in these artificial streams, the clams (n = 14–16 per condition) were separately exposed for 10 days to crude oil alone, crude oil and barium, crude oil and noise pollution, crude oil and turbidity pulses, barium alone, noise pollution alone, turbidity pulses alone or natural changes alone. The secondary objective was to characterize the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in 3 tissues (gills, adductor muscles and foot) in clams exposed for 10 days to crude oil alone or under multistress conditions (n = 5 clams per condition) and then to compare the accumulation and behaviour of clams under these conditions. The response of clams to crude oil alone or under multistress conditions was visually and statistically significant and not confounded by the other disturbances tested, despite large variations in water temperature. In the presence of crude oil, the behaviour of clams was characterized by an increase in valve-closure duration, a decrease in valve-opening amplitude and an increase in valve agitation index. In the presence of crude oil, the clam behaviour showed no direct relationship with PAH accumulation in the gills, adductor muscles or foot, although hypothetical mechanisms are discussed. This work supports the growing interest in studying the behaviour of bivalve mollusks in the context of biomonitoring of the aquatic environment surrounding oil facilities.

### 1. Introduction

Behavioural ecotoxicology is an emerging approach that can be used in the evaluation of ecological risk by serving as a bridge between laboratory and field studies (Pyle and Ford, 2017). Behaviour as a result of environment factors and physiological, cellular or biochemical processes (Amiard-Triquet, 2009; Saaristo et al., 2018) is considered as a particularly relevant and sensible marker for assessing environmental quality and the consequences of pollutants for organisms (Gerhardt, 2007). For example, Melvin and Wilson (2013) conducted a meta-analysis of the literature and showed that although behavioural studies

are generally carried out for shorter periods than developmental or reproductive studies, they are often significantly more sensitive to a wide range of compounds and lower concentrations. Within this framework, the development of innovative approaches in relation to behaviour is fundamental for improving the monitoring of human activities on the environment. This is especially true for aquatic ecosystems, which are faced with strong anthropogenic pressures and where understanding the consequences of these pressures is a tremendous challenge (Borja, 2014). The investigation of *in situ* technologies for monitoring environmental aquatic status has shown that there are several methods and tools of interest, such as the use of biosensor behaviours

\* Corresponding author at: University of Bordeaux, EPOC, UMR 5805, Arcachon, France.

E-mail address: [jean-charles.massabuau@u-bordeaux.fr](mailto:jean-charles.massabuau@u-bordeaux.fr) (J.C. Massabuau).

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105381>

Received 28 October 2019; Received in revised form 5 December 2019; Accepted 5 December 2019

Available online 10 December 2019

0166-445X/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



proposed decades ago (Danovaro et al., 2016; Queirós et al., 2016). However, ensuring the ecological validity of the behavioural approach is a complex challenge (Parker, 2016). In the present work, the behavioural responses of Asiatic clams, *Corbicula fluminea*, were studied by HFNI Valvometry (High-frequency, noninvasive Valvometry; Andrade et al., 2016) in mono and multistress contexts by using freshwater outdoor artificial streams that were representative of a natural environment.

Regarding bivalve mollusks, many studies in laboratories, semi-natural environments or *in situ* have reported the potential of studying their behaviour to reflect environmental changes (e.g., Garcia-March et al., 2016; Guo and Feng, 2018; Hartmann et al., 2016; Miller and Dowd, 2017). They are ecologically relevant for behavioural biomonitoring by remote control because they have an exoskeleton composed of two hard shells to glue light electrodes and record behavioural responses without disturbing them, they are sedentary, sessile, abundant and available all year round and they are filter feeders which allows to overcome the need to feed them. However, few reports have focused on crude oil detection (Dragsund et al., 2013; Kramer et al., 1989; Redmond et al., 2017). Using the mussel *Mytilus edulis* under laboratory conditions and changes of its valve activity, Kramer et al. (1989) demonstrated the practical feasibility of detecting dispersed crude oil at a concentration of  $< 6000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . More recently, Dragsund et al. (2013) reported additional information for crude oil concentrations  $\geq 180 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in the context of leak detection in the natural environment. Finally, Redmond et al. (2017) showed a decrease in the valve gap of the marine mussel *Mytilus edulis* exposed for 4 days to North Sea crude oil under laboratory conditions at nominal concentrations of 60 and  $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

In the current work, a main goal was to study the distinguishability and reproducibility of behavioural responses of *C. fluminea* to crude oil in a multistress context. In artificial streams fed by the Gave de Pau river (S.W. France) and subjected to natural variations, clams were exposed for 10 days to crude oil alone or to crude oil plus a metallic trace element (barium), noise pollution (cargo ship noise) or turbidity pulses. The rationale behind these choices is (i) few data are available regarding the effects of barium despite its significant presence in produced waters (Neff et al., 1987, 2011), (ii) underwater noise pollution is inherent to industrial activities, and bivalve mollusks are sensitive to noise, including that of cargo ships (Charifi et al., 2017, 2018) and continuous noise (Shi et al., 2019), and finally (iii) turbidity episodes are part of the background changes that routinely occur in many rivers and estuaries. We show that key aspects of the behavioural response to oil are visually and statistically discriminating. They were not confounded by the presence of the other disruptors tested, alone or in combination with crude oil, under semi-natural conditions. In addition, the analysis of PAH in different tissues allowed us to characterize the contamination status and its relationship with behavioural changes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and experimental design

The experiment was carried out from October to December 2016. Samples of Asiatic clams, *Corbicula fluminea*, (height, 24–28 mm) were taken from Parentis – Biscarrosse Lake, France (44°22'6"N, 1°11'3"W). They were maintained in 600 L tanks supplied with freshwater in an open circuit at the Arcachon Marine Station, France. The clams ( $n = 128$ ) were equipped with HFNI electrodes (Andrade et al., 2016) one week before being transferred to the Pilot Rivers facilities of TOTAL, Lacq, France (Bassères and Tramier, 2001; Sourisseau et al., 2008; for an overall view of the experimental site see Fig. 1 in Cailleaud et al., 2019). We worked in 8 parallel artificial streams equipped as shown in Fig. 1A, B (length, 40 m; width, 0.5 m; depth, 0.5 m) and supplied by an open circuit with freshwater from the Gave de Pau River. Streams were exposed to natural variations; the water was not filtered

or treated, and an upstream nursery constituted a reservoir of living organisms, promoting natural colonization (Bassères et al., 2004). For the specific requirements of the experiment, a water depth of 0.25 m in each stream was defined, and 2 quartz and silica sand zones A and B (length, 1 m; depth, 0.1 m) were created to allow natural burrowing of the clams. Measured from the injection site, zone A was at 19–20 m and zone B at 29–30 m (Fig. 1B). The water velocity in all streams was similar, at  $3 \text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$  ( $6 \text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$  in zone A and B), and the residence time for a drifter was  $\approx 22 \text{ min}$ .

### 2.2. Experimental protocol

The experiment was divided into 4 periods with  $t_0$  being the beginning of the exposure period. Period 1 was a 16-day acclimation period to the artificial streams (26<sup>th</sup> October – 9<sup>th</sup> November;  $t_{26} - t_{12}$ ). Period 2, from 11<sup>th</sup> November ( $t_{10}$ ) to 20<sup>th</sup> November ( $t_{11}$ ), was the reference period used for comparison with the exposure period. Period 3 (21<sup>st</sup> November – 1<sup>st</sup> December),  $t_0 - t_{10}$ , was the exposure period. The exposure period was started simultaneously in all streams on  $t_0$  at 03:15 PM (GMT + 1; 21<sup>st</sup> November). It ended at  $t_{10}$  on 1<sup>st</sup> December at 03:15 PM (GMT + 1). Period 4, from 2<sup>nd</sup> to 11<sup>th</sup> December ( $t_{11} - t_{20}$ ), was a 10-day post-exposure period.

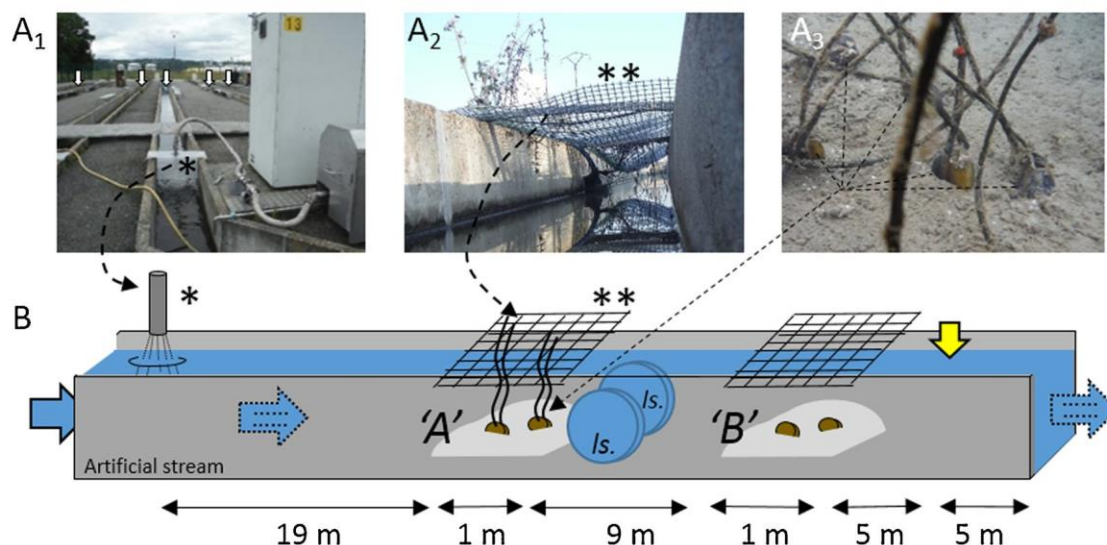
In each artificial stream, a group of 16 clams was equipped for the study of behaviour in all A zones (Fig. 1B). The area was covered with a wire mesh to prevent bird predation (Figs. 1A<sub>2</sub> and 1A<sub>3</sub>). A second set of groups ( $n = 20$ ) was placed in cages burrowed in the B zones for tissue sampling (Fig. 1B). The spacing between the A and B zones made it possible to sample in B without disturbing clams in A. Stream C was the control stream and was subjected to natural variations only. In stream O (oil), clams were exposed to oil only; in stream Ba (barium), to barium only; in stream N (noise), to noise pollution only; and in stream T (turbidity), to turbidity pulses only. In stream O + Ba, clams were exposed to oil plus barium; in stream O + N, to oil plus noise pollution and in stream O + T, to oil plus turbidity pulses.

The crude oil was a light oil from the North Sea. The density was 0.77 (at 15 °C), and the dynamic viscosity was 1.016 mPa·s (at 15 °C). SARA analysis indicated that the residue fraction (representing 28.2 % of the crude oil, compared to 71.8 % for the distillate fraction) contained 84 % saturated hydrocarbons, 15.5 % aromatic hydrocarbons and 0.5 % polar compounds. Crude oil stored under inert nitrogen was continuously injected ( $6.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ ) into the streams by a piston pump (Prominent) and mechanically dispersed in the water as microdroplets through a high-pressure pump and a shearing valve (Netzsch, Nemo; Fig. 1A<sub>1</sub> and B). Barium ( $\text{BaCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$ ; Sigma-Aldrich; CAS Number: 10326-27-9) stored under inert nitrogen was continuously injected ( $40 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ ) by a piston pump (Prominent). Turbidity pulses were carried out with green clay (Les argiles du soleil; CAS number: 1318-93-0) that was previously homogenized (Joffe Agitateurs) with the Gave de Pau water in 200 L tanks and injected into the streams ( $76 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ) with a peristaltic pump (Cole-Parmer; Masterflex L/S) from 02:00 to 05:00 PM (GMT + 1) on days  $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ ,  $t_4$ ,  $t_7$ ,  $t_8$  and  $t_9$ . Noise pollution was achieved using 2 underwater loudspeakers (US-0130; Randson; France) positioned on either side of the two areas where clams were present and an amplifier (AM60A; RONDSON; France), Fig. 1B. A playlist was created (Cool Edit; version 2.0; Syntrium Software Corporation; USA) using a 16 min cargo ship noise previously recorded in the port of Santander, Spain (see Charifi et al., 2018 for more details). A 3-day sound pattern was created (5–8 cargo ship noises per day) and repeated during the experiment.

### 2.3. Follow-up of exposure parameters

#### 2.3.1. Analysis of crude oil contamination

Oil injection rates were measured on days  $t_1$ ,  $t_3$ ,  $t_4$ ,  $t_7$ ,  $t_8$  and  $t_9$  to maintain a nominal concentration of  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The measured oil injection rates were  $6.6 \pm 0.43 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$  in stream O,  $6.7 \pm 0.07 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$



**Fig. 1.** Outdoor mesocosm and semi-natural conditions along the Gave de Pau river (Lacq, France). (A) Experiments were performed in 8 parallel artificial streams ( $40 \times 0.5 \times 0.5$  m; white arrows on Fig. 1A<sub>1</sub> show 5 of them) supplied by an open circuit from the Gave de Pau River. (B), schematic view showing the organization in each stream. From left to right: water arrival; \* injection point for oil, barium or turbidity (Fig. 1A<sub>1</sub>); 'A' and 'B', two sand zones covered by anti-bird nets\*\* (Fig. 1A<sub>2</sub>) for *C. fluminea* equipped for behaviour recordings in zone 'A' (Fig. 1A<sub>3</sub>) and for tissue samplings in zone 'B'. Two underwater loudspeakers *ls.* were mounted facing each other at 0.2–1 m from clams in zone 'A' to reproduce noise pollution. Yellow arrow, location of the sampling point for water analyses. See Fig. 1 in Cailleaud et al. (2019) for an overall view.

**Table 1**

Inter-comparison p-values of the injection rates measured in the 4 streams involved in the oil contamination.

	O	O + Ba	O + N
O + Ba	1	–	–
O + N	1	1	–
O + T	1	0.5	0.24

in stream O + Ba,  $6.8 \pm 0.26 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$  in stream O + N and  $6.0 \pm 0.39 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$  in stream O + T. The measured rates, and therefore the quantities of oil injected, were not different between the 4 contaminated streams (Table 1). In-stream measurements of total petroleum hydrocarbon (TPH) were performed on days  $t_1$ ,  $t_3$ , and  $t_{10}$ . Water was sampled 35 m downstream of the injection point (Fig. 1B) in the centre of the stream and in the centre of water column in 1 L glass bottles. It was stabilized with methanol and nitric acid. The TPH were extracted with 40 mL of hexane and concentrated under nitrogen flux to be analyzed by gas chromatography with flame-ionization detection (GC-FID) with Agilent 7890 B GC system (equipped with a 15 m Agilent CP7491 column) and integration of total peak area between C10 and C40. The mean measured concentration was  $167 \pm 28 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### 2.3.2. Analysis of barium contamination

The water was analysed for barium (Ba) concentration on days  $t_0$ ,  $t_1$ ,  $t_3$  and  $t_{10}$  in streams C, Ba and O + Ba. The samples were collected in previously cleaned polypropylene tubes (72 h in 5 % regal water and rinsing with ultrapure water). For all samples, 9 mL of water was sampled 35 m downstream of the Ba injection, in the centre of the stream and in the centre of water column (Fig. 1B). Samples were immediately filtered with a  $0.2 \mu\text{m}$  syringe filter (PVDF 33 mm sterile; DDD), acidified with 1 mL of nitric acid ( $\text{HNO}_3$  65 %; Carlo Erba Reagents) and stored in the dark at  $4^\circ\text{C}$ . Analyses were performed by inductively coupled plasma optical spectrometry (ICP OES 700 Series; Agilent). Concentrations of all analytical blanks were below the detection limit of Ba ( $0.03 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ );  $14.2 \pm 0.06 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  was the mean geochemical background noise for samples taken before contamination in all streams ( $n = 3$ ). During contamination, the Ba concentration was  $99.7 \pm 5.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $n = 3$ ) in the Ba stream and  $90.4 \pm 4.7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

( $n = 3$ ) in the O + Ba stream (not significantly different,  $p = 0.456$ ). In contrast, these levels were significantly higher than that in the C stream ( $12.6 \pm 0.55 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

### 2.3.3. Analysis of turbidity pulses

The turbidity was analyzed manually with a portable turbidimeter (Hack; 2100Qts). Samples were collected 35 m downstream of the injection point, in the centre of the stream and water column (Fig. 1B). During pulses, the turbidity was  $268 \pm 20 \text{ NTU}$  ( $n = 8$ ) in the T stream and  $263 \pm 21 \text{ NTU}$  ( $n = 8$ ) in the O + T stream (not significantly different,  $p = 0.8732$ ). The turbidity during pulses was significantly different from the natural turbidity measured in the C stream ( $43 \pm 26 \text{ NTU}$ ;  $n = 8$ ;  $p = 0.0020$  between C and T streams, and  $p = 0.0023$  between C and O + T streams).

### 2.3.4. Analysis of noise pollution

The background noise was measured using a broadband hydrophone with an internal buffer amplifier (H2a-XLR; sensitivity,  $-180 \text{ dB re } 1 \text{ V}\cdot\mu\text{Pa}^{-1}$ ; useful range, 10 Hz to 100 kHz; Aquarian) and an Edirol recorder (H4n Handy; Zoom Corporation; Japan) that was previously calibrated (see Charifi et al., 2018 for details). Recordings were taken at the water–sediment interface in the centre of the stream, and therefore between the 2 loudspeakers (Fig. 1B). The clams were at a distance of between 0.2 and 1 m from the centre of the 2 loudspeakers. At 0.2 m, the maximum sound pressure level (SPL) was  $161 \pm 3 \text{ dBrms re } 1 \mu\text{Pa}$  ( $n = 3$ ). At 0.6 m, it was  $150 \pm 1 \text{ dBrms re } 1 \mu\text{Pa}$  ( $n = 2$ ), and at 1 m,  $142 \text{ dBrms re } 1 \mu\text{Pa}$  ( $n = 1$ ). The average background noise was  $88 \pm 1 \text{ dBrms re } 1 \mu\text{Pa}$  ( $n = 6$ ).

## 2.4. Analysis of clam behaviour

### 2.4.1. HFNI valvometry

The clam behaviour (i.e., valve activity) was studied by HFNI valvometry (Andrade et al., 2016; Tran et al., 2003). For this, 2 lightweight electromagnets were positioned face-to-face on each valve (Fig. 1A<sub>3</sub>). The voltage variation produced by the electromagnetic current between two electromagnets is governed by Maxwell's law. The frequency of data acquisition (time, bivalve number, voltage) in a group of 16 bivalves was 10 Hz, or every 1.6 s per bivalve. The data were recorded by

an acquisition card and were automatically transmitted daily to a processing unit located at the Arcachon Marine Station, France. The data were then automatically and daily processed with R (R Core Team, 2016) and published online on the professional pages of the MolluSCAN eye website (<https://molluscan-eye.epoc.u-bordeaux.fr/>). All behavioural analyses were performed by remote control in Arcachon, France.

#### 2.4.2. Behavioural parameters

**2.4.2.1. Valve-opening amplitude (VOA).** Each valve gap value was associated with a valve-opening-amplitude, expressed as a percentage. The valve amplitude values of 0 % and 100 % were defined as the minimum and maximum values of each bivalve over the previous 6 days. Therefore, the valve amplitude was calculated for each bivalve as the ratio of the valve gap (mm) subtracted from the minimum value (mm) and from the maximum value (mm) subtracted from the minimum value (mm). This parameter was then determined for each group of bivalves, averaging the individual values each hour to give the percentage of hourly valve-opening amplitude for the group.

**2.4.2.2. Valve-closure duration (VCD).** The mean percentage of the hourly valve-closure duration in the group was based on the closing duration of each bivalve, each hour (the bivalve was considered closed at less than 5 % of maximum valve opening). Thus, if the bivalve was closed for one hour, the percentage of valve-closure duration was 100 %. By contrast, if the bivalve remained open for one hour, the percentage of valve-closure duration was 0 %. This parameter was then determined for each group of bivalves, averaging the individual values each hour to give the percentage of hourly valve-closure duration for the group.

**2.4.2.3. Valve agitation index (VAI).** Valve agitation was obtained by measuring the distance travelled by the electrodes glued on the valves. Every 1.6 s the distance travelled was measured, in absolute value, by subtracting the value of the valve gap from the previous value (mm) and then an hourly sum was realized for each bivalve. Lastly, this parameter was determined for each group of bivalves by averaging individual values each hour to give the hourly valve agitation. To weight this parameter, the hourly valve agitation of each group of bivalves was divided by the percentage of hourly valve-opening amplitude of the same group of bivalves, this was the hourly valve agitation index.

#### 2.4.3. Response time

The first valve closure reaction or, more rarely, the beginning of a brief series of openings and closings followed by a continuous valve closure reaction were considered to be the first behavioural response of clams to the presence of disruptors in the water (Tran et al., 2003). A response percentage, based on the use of binary variables, was then established for the group of bivalves from the start of the exposure period ( $t_0$ ; 03:15 PM; GMT + 1) thanks to the individual behavioural analysis of each bivalve at different integration times (10; 20; 30; 60; 60; 12; 300; 480; 600; 720 min). A logistic regression model was then used to estimate the response percentage of bivalves over time. The following logistic function was applied:

$$f(x) = (\exp(\beta_0 + \beta_1 \cdot x)) / (1 + \exp(\beta_0 + \beta_1 \cdot x))$$

$\beta_0$  and  $\beta_1$  are unknown regression parameters. Once these parameters are known, the response times necessary for 10–90 % of the bivalves to react can be determined.

#### 2.5. PAH analysis in clam tissues

A total of 21 PAH (naphthalene, benzothiophene, biphenyl, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, dibenzothiophene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)

fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(e)pyrene, benzo(a)pyrene, perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene and benzo(g,h,i)perylene), among which are 16 listed as priority pollutants by the US EPA (United States Environmental Protection Agency; underlined in the list) were analyzed in the gills, foot and adductor muscles of 5 randomly sampled clams per artificial stream at  $t_{10}$ . The mass of analyzed tissue (mean  $\pm$  standard deviation) was  $46 \pm 8$  mg wet weight (w.w.) for muscle,  $67 \pm 11$  mg w.w. for foot and  $53 \pm 12$  mg w.w. for gills. The analyses were performed by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-tandem mass spectrometry (SBSE-GC-MS/MS) as described in Lacroix et al. (2014). Briefly, each tissue was digested by saponification and analytes were extracted for 2 h at 700 rpm using polydimethylsiloxane stir bars (Twister 20 mm x 0.5 mm, Gerstel). The bars were subsequently analyzed using a gas chromatography system (Agilent 7890A) coupled to an Agilent 7000 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies) and equipped with a thermal desorption unit (TDU) combined with a cooled injection system (Gerstel). Thermodesorption and GC-MS/MS conditions were as previously described (Lacroix et al., 2014). Analytes were quantified relative to deuterated compounds using a calibration curve ranging from 0.01 ng to 10 ng per bar. Two compounds, benzo(b)fluoranthene and benzo(k)fluoranthene, were quantified as a sum named benzo(b + k)fluoranthene due to poor resolution. The limits of quantification (LOQ) were calculated by the calibration curve method (Shrivastava and Gupta, 2011), and the limit of detection (LOD) was estimated by dividing the LOQ by 3.

#### 2.6. Statistics

The results are reported as means  $\pm$  1 SE and box plots of mean hourly values. After checking for assumptions of normality and homoscedasticity of error term, comparisons between variables were investigated using the non-parametric Kruskal-Wallis test. For all pairwise comparisons of independent samples, Dunn's or Conover's tests with Holm adjustment (PMCMR package; Pohlert, 2014) were considered. For all pairwise comparisons of paired samples, the pairwise Wilcoxon test was used with Holm adjustment. For all statistical results, a probability of  $p < 0.05$  was considered to be significant. The data were computed and analyzed using R software (R Core Team, 2016).

### 3. Results

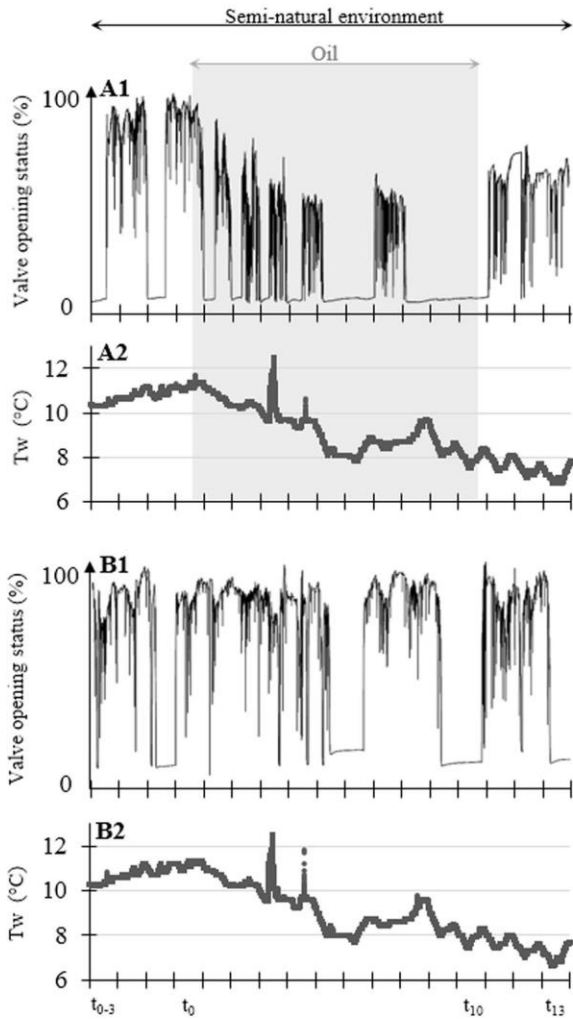
#### 3.1. Individual clam behaviours

No mortality was recorded during the exposure and post-exposure periods. During the reference period, 1 clam died in stream T, and the recordings of 3 clams were lost due to technical problems (2 clams in stream O + Ba and 1 clam in stream O + N).

A visual study of the individual behaviours of each clam preceded the analysis of the group behaviour. Fig. 2 A1 shows a 16-day record, including the 10-day exposure period of a clam exposed to crude oil (stream O) at the nominal concentration of  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . This behaviour was compared with the typical behaviour of a clam in the control (C) stream (Fig. 2B1) and with the natural water temperature ( $T_w$ ) change during the same period (Fig. 2A2). Visually, the response to oil was characterized by a decrease in valve-opening amplitude, an increase in valve-closure duration and an increase of the valve agitation index. This behavioural response to crude oil was not confounded by the behaviour of the clams subjected to only natural variations despite the  $T_w$  changes in the range  $12.5 - 7.5^\circ\text{C}$  for stream O and  $12.5 - 7.4^\circ\text{C}$  for stream C during the exposure period ( $t_0 - t_{10}$ ). Throughout the  $t_{10} - t_{20}$  period,  $T_w$  varied from  $6.6$  to  $12.5^\circ\text{C}$ .

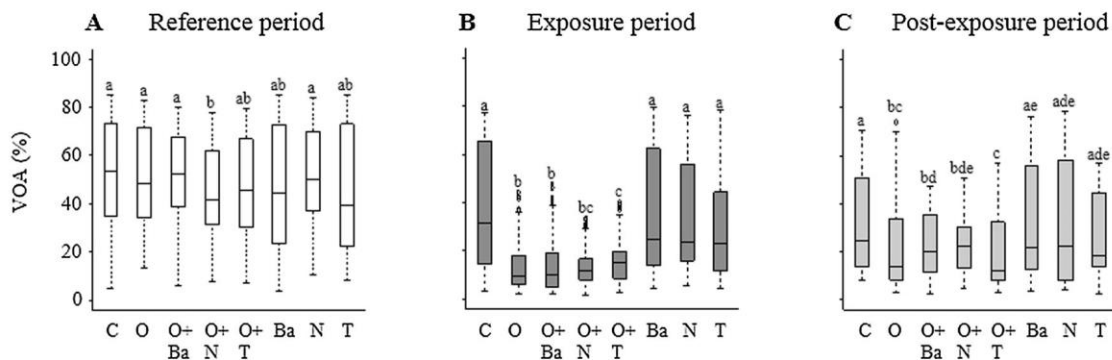
#### 3.2. Behaviour of clam groups

In this part, we compared the hourly valve-opening amplitudes (VOA), hourly valve-closure durations (VCD) and hourly valve agitation



**Fig. 2.** Typical behaviours of clams with or without crude oil in outdoor artificial streams subjected to natural variations. (A1) the typical behaviour of a clam before, during and after exposure to crude oil; (A2) Tw, water temperature. (B1) the parallel behaviour of a reference clam unexposed to crude oil; (B2) Tw over the same time period.

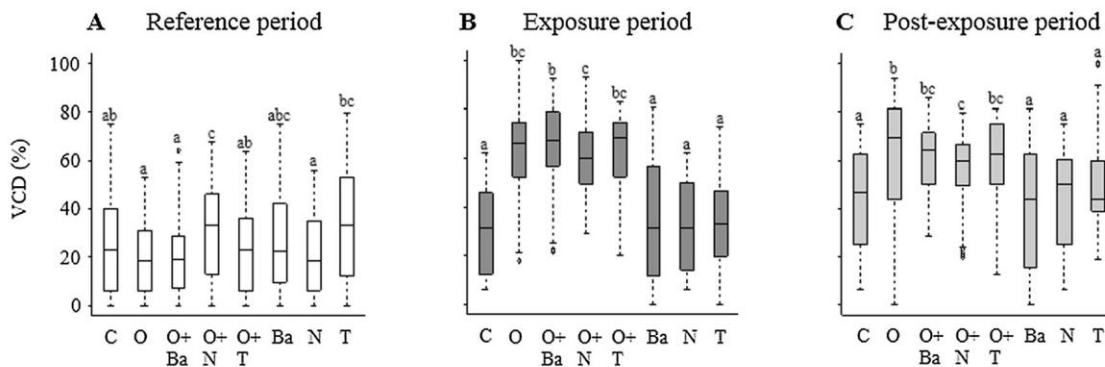
index (VAI) in all artificial streams during the reference ( $t_{-10}$  to  $t_{-1}$ ), the exposure ( $t_1$  to  $t_{10}$ ) and the post-exposure ( $t_{11}$  to  $t_{20}$ ) periods. The 1st day of the exposure period ( $t_0$ ) was excluded because it was considered as a transitional day.



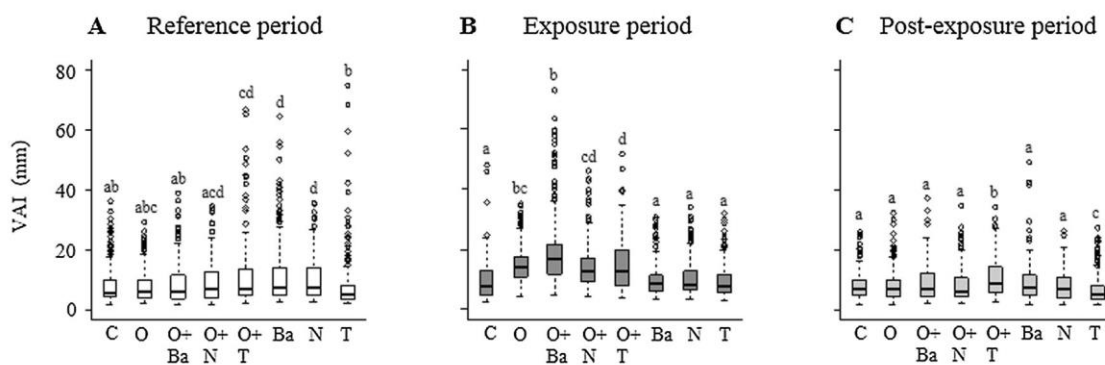
**Fig. 3.** Comparison of the average hourly valve-opening amplitude (%) between artificial streams for each period. Mean hourly valve amplitude (%) for 14–16 clams. (A) the reference period ( $t_{-10}$  to  $t_{-1}$ ), (B) the exposure period ( $t_1$  to  $t_{10}$ ) and (C) the post-exposure period ( $t_{11}$  to  $t_{20}$ ) for each artificial stream (C, control; O, oil; O + Ba, oil and barium; O + N, oil and noise pollution; O + T, oil and turbidity pulses; Ba, barium; N, noise pollution; T, turbidity pulses). Boxplot ( $n = 240$  values; 24 h x 10 days). Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ; Dunn Test with Holm adjustment).

Fig. 3 shows the average hourly valve-opening amplitudes for the 8 artificial streams during the reference (Fig. 3A), the exposure (Fig. 3B) and the post-exposure (Fig. 3C) periods, with  $n = 240$  mean values for each period in each stream (24 h x 10 days). The homogeneity of valve-opening amplitudes in clams subjected only to natural variations within the different artificial streams during the reference period is shown in Fig. 3A. During the exposure period (Fig. 3B), compared to the clams of the control stream (C) subjected to natural variations only, the valve-opening amplitudes significantly decreased in the presence of oil alone (O) ( $p < 2.2e-16$ ), O + Ba ( $p < 2.2e-16$ ), O + N ( $p < 2.2e-16$ ) and O + T ( $p < 2.2e-16$ ). The hourly valve-opening amplitudes during Ba, noise and turbidity pulse exposures alone were not different from the valve-opening amplitude in the control stream (respectively,  $p = 0.864$ ;  $p = 1$ ;  $p = 1$ ). Therefore, the decrease in valve-opening amplitude induced by oil was not modified by the addition of barium, noise pollution or turbidity pulses. During the post-exposure period (Fig. 3C), compared to the clams exposed to natural variations only (C), the clams exposed to oil alone, O + Ba, O + N or O + T exhibited lower opening amplitudes (respectively,  $p = 7.1e-08$ ;  $p = 1.3e-04$ ;  $p = 2.3e-03$  and  $p = 1.4e-13$ ). The behaviour of clams exposed to oil was therefore still disrupted during the post-exposure period. In contrast, the opening amplitudes of clams exposed to Ba, N and T remained identical to the opening amplitudes of clams exposed to natural variations only (respectively,  $p = 1$ ;  $p = 0.13$ ;  $p = 0.22$ ).

Fig. 4 shows the average hourly valve-closure durations for the 8 artificial streams and for the 3 time periods, reference (Fig. 4A), exposure (Fig. 4B) and post-exposure (Fig. 4C), again with  $n = 240$  mean values for each artificial stream and period. The homogeneity and/or natural changes of valve-closure duration in clams subjected to natural variations during the reference period is presented in Fig. 4A. During the exposure period, the increase in the valve-closure duration was significantly marked by the presence of crude oil (Fig. 4B). Indeed, compared to the control (C), the hourly valve-closure durations increased in the presence of O ( $p < 2.2e-16$ ), O + Ba ( $p < 2.2e-16$ ), O + N ( $p < 2.2e-16$ ) and O + T ( $p < 2.2e-16$ ), while remaining unchanged for the clams exposed to Ba, noise and turbidity pulses (respectively,  $p = 0.77$ ;  $p = 1$ ;  $p = 1$ ). The increase in valve-closure duration in the presence of crude oil was therefore not confounded by the other studied disrupters (Fig. 4B). During the post-exposure period (Fig. 4C), the behaviour of the clams exposed to oil was different from those not exposed to oil. Specifically, compared to the control clams, the clams exposed to O alone, O + Ba, O + N or O + T exhibited a longer valve-closure duration (respectively,  $p < 2.2e-16$ ;  $p < 2.2e-16$ ;  $p = 1.3e-09$ ;  $p < 2.2e-16$ ). According to this parameter, the behaviour of clams exposed to oil was therefore still disrupted during the post-exposure period. In contrast, during the post-exposure period, the valve-closure duration of clams exposed to Ba, noise and turbidity



**Fig. 4.** Comparison of the average hourly valve-closure duration (%) between artificial streams for each period. Mean hourly valve-closure duration (%) for 14–16 clams. (A) the reference period ( $t_{10}$  to  $t_{11}$ ), (B) the exposure period ( $t_1$  to  $t_{10}$ ) and (C) the post-exposure period ( $t_{11}$  to  $t_{20}$ ) for each artificial stream (C, control; O, oil; O + Ba, oil and barium; O + N, oil and noise pollution; O + T, oil and turbidity pulses; Ba, barium; N, noise pollution; T, turbidity pulses). Boxplot ( $n = 240$  values; 24 h x 10 days). Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ; Dunn Test with Holm adjustment).



**Fig. 5.** Comparison of the hourly valve agitation index (mm) between artificial streams for each period. Distance travelled by valves during opening states for 14–16 clams during (A) the reference period ( $t_{10}$  to  $t_{11}$ ), (B) the exposure period ( $t_1$  to  $t_{10}$ ) and (C) the post-exposure period ( $t_{11}$  to  $t_{20}$ ) for each artificial stream (C, control; O, oil; O + Ba, oil and barium; O + N, oil and noise pollution; O + T, oil and turbidity pulses; Ba, barium; N, noise pollution; T, turbidity pulses). Boxplot ( $n = 240$  values; 24 h x 10 days). Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ; Dunn Test with Holm adjustment).

pulses was not different from the control clams ( $p = 1$ ).

Fig. 5 shows the average hourly valve agitation index (i.e., the valve agitation weighted by the valve-opening amplitude) for the 8 artificial streams and for the 3 time periods, showing the reference (Fig. 5A), exposure (Fig. 5B) and post-exposure (Fig. 5C), with  $n = 240$  mean values for each artificial stream and period. The homogeneity of the valve agitation index in clams subjected to natural variations during the reference period is presented in Fig. 5A. During the exposure period, the increase in the valve agitation index was significant in the presence of crude oil (Fig. 5B). Indeed, compared to the control (C), the hourly valve agitation index increased in the presence of O ( $p < 2.2 \times 10^{-16}$ ), O + Ba ( $p < 2.2 \times 10^{-16}$ ), O + N ( $p < 2.2 \times 10^{-16}$ ) and O + T ( $p = 6.5 \times 10^{-16}$ ). In contrast, the hourly valve agitation index of the clams exposed to Ba, noise or turbidity alone were not different from the control situation (respectively,  $p = 0.975$ ;  $p = 0.143$ ;  $p = 1$ ). The increase in valve agitation index in the presence of crude oil was therefore not confounded by the other disrupters studied (Fig. 5B). During the post-exposure period (Fig. 5C), only the behaviour of the clams exposed to O + T and T were statistically different from all the others.

### 3.3. Response time of clams

The first valve closure reaction or, more rarely, the beginning of a brief series of openings and closings followed by a continuous valve closure reaction, appeared at between 6.3 and 7.8 h after exposure to crude oil in the artificial streams for 50 % of the clams (Fig. 6). More precisely, the response time for 50 % of clams was 7.8 h in O exposure, 6.3 h in O + Ba exposure, and 6.9 h in O + N and O + T exposures. Without oil, the response time for 50 % of clams was 11.2 h in T

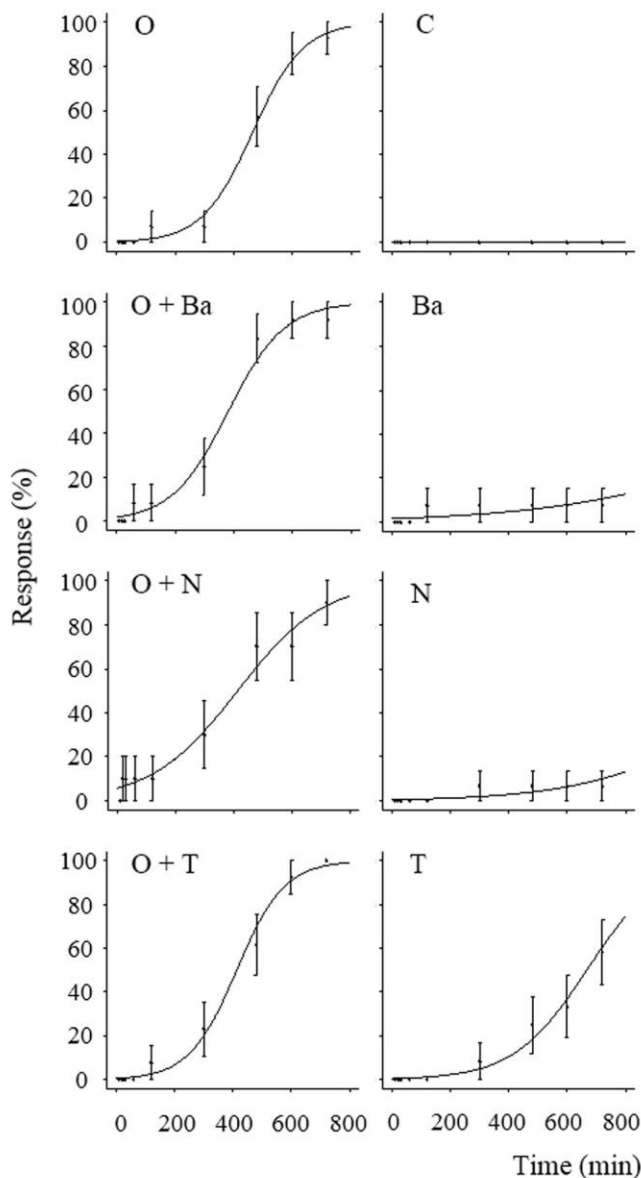
exposure. Furthermore, the response time for 90 % of clams was 10.9 h in O exposure, 9.9 h in O + Ba exposure, 12.3 h in O + N exposure and 9.8 h in O + T exposure. The response time for 10 % of clams was only 4.7 h in O exposure, 2.8 h in O + Ba exposure, 1.4 h in O + N exposure, 3.9 h in O + T exposure (Fig. 6).

### 3.4. PAH accumulation

Fig. 7 shows the PAH contamination status at  $t_{10}$  in the gills, the foot and the adductor muscles of control and oil-exposed clams. Not surprisingly, the gills were the most contaminated tissue. Accumulation in the foot was intermediate, and the adductor muscles were the least contaminated ( $p_{\text{gills-foot}} = 6.5 \times 10^{-5}$ ;  $p_{\text{gills-muscles}} = 7.5 \times 10^{-12}$ ;  $p_{\text{foot-muscles}} = 5.5 \times 10^{-5}$ ). In the gills, the contamination was significantly greater in the presence of O, O + Ba and O + N in comparison to the control (respectively,  $p = 1.5 \times 10^{-2}$ ;  $p = 1.2 \times 10^{-4}$ ;  $p = 1.1 \times 10^{-2}$ ). In the foot, the differences were significant between control and O + Ba ( $p = 9.1 \times 10^{-4}$ ) but also between O and O + Ba ( $p = 1.3 \times 10^{-2}$ ). In the adductor muscles, contamination was not statistically different between the different artificial streams. However, the highest median values, whether in the gills, foot or adductor muscles, were always observed under the O + Ba condition (Fig. 7).

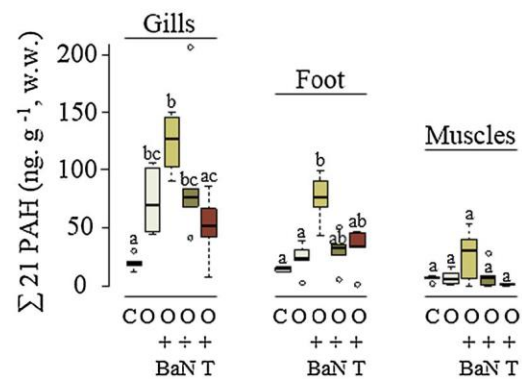
## 4. Discussion

The primary purpose of this study performed under outdoor semi-natural conditions with *C. fluminea* was to identify, if any, a reliable and therefore discriminating behavioural response to crude oil in a multi-stress context. The second purpose was to complement the behavioural



**Fig. 6.** Response time under mono- and multistress conditions. A logistic regression of response time for the clams in each artificial stream (C, control; O, oil; O + Ba; oil and barium; O + N, oil and noise pollution; O + T, oil and turbidity pulses; Ba, barium; N, noise pollution; T, turbidity pulses). The response percentage is estimated for the group of clams using individual responses from the start of exposure ( $t_0$ ; 03:15 PM; GMT + 1) at different integration times (10; 20; 30; 60; 120; 300; 480; 600 and 720 min).

response of *C. fluminea* by analyzing the PAH contamination of target organs, including the gills, which is a major entrance route for contaminants, and two organs involved in clam shell movements, the foot and the adductor muscles. The main finding was that the response of *C. fluminea* to crude oil in a naturally variable environment and in the presence of multiple stress exposures (cargo ship noise, turbidity pulses and barium) is clearly distinguishable and can be identified by 3 parameters: the valve-opening amplitude, valve-closure duration and valve agitation index. While a single crude oil concentration was studied (a nominal value of  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), the PAH accumulation in the three tested tissues was quite variable, illustrating the inter-individual variability. However, the PAH accumulation was always at the maximum value when barium was added to oil, the condition under which valve agitation was also at its highest level.



**Fig. 7.** Comparison of PAH concentrations ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , w.w.) in clam tissues between artificial streams after 10 days of exposure. Sum of the individual concentrations of the 21 PAH analyzed in the gills, foot and adductor muscles of 5 clams in each artificial stream (C, control; O, oil; O + Ba; oil and barium; O + N, oil and noise pollution; O + T, oil and turbidity pulses; Ba, barium; N, noise pollution; T, turbidity pulses) after 10 days of exposure ( $t_{10}$ ). Boxplot ( $n = 5$  clams per artificial stream). Different letters indicate significant differences, independent for each tissue ( $p < 0.05$ ; Conover test with Holm adjustment).

#### 4.1. Behavioural response of bivalve mollusks in the presence of crude oil alone

As discussed in the Introduction, despite behaviour being understood as a particularly sensitive marker to assess water quality and its potential use in the oil and gas field, relatively few studies have described the valve activity of bivalve mollusks during crude oil contamination. An advanced study that has been carried out is the laboratory work by Redmond et al. (2017). The authors described the behaviour of the marine mussel *Mytilus edulis* in response to light North Sea crude oil alone, under controlled conditions for 4 days, at 3 different nominal concentrations:  $15$ ,  $60$  and  $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  at a water temperature of  $13^\circ\text{C}$ . Behavioural parameters studied were the distance travelled by the valves, the valve gap and the time spent in various valve positions. Their results showed a statistically significant reduction in valve gap (i.e., valve amplitude) at  $60$  and  $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . A few other studies can be mentioned. They were all carried out under laboratory conditions with much higher oil concentrations, from  $50$  to  $1000 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of crude oil (Hartwick et al., 1982; Stainken, 1976; Swedmark et al., 1973). Swedmark et al. (1973) stated that contamination with  $1000 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of Oman crude oil ( $96 \text{h}$ ;  $T_w = 10 \pm 2^\circ\text{C}$ ) did not alter the closing capacity of the scallop *Pecten opercularis* and the mussel *Mytilus edulis*. Stainken (1976) reported a depression of muscle contraction with an increase in mucus secretion in the marine bivalve *Mya arenaria* exposed for  $96 \text{h}$  to different concentrations of Southern Louisiana Crude oil ( $50$ – $800 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $T_w = 4$  and  $14^\circ\text{C}$ ). Hartwick et al. (1982) carried out contamination of the clam *Protothaca staminea* for  $5 \text{h}$  per day over  $5$  days with  $100$  and  $1000 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of Alberta crude oil and reported two separate behavioural response panels. At  $100 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , valves were tightly closed, and when they opened the retraction reaction of siphons was normal. At  $1000 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , the retraction reaction of siphons was slower, and a wide shell gap was observed during exposure to air. This wide valve gap was followed by a closure with (sometimes) the pinching of siphons on the outside of the shell. Overall, independent of the concentration, the valve closure reaction has been proposed by most authors as a protective reaction to the sublethal effects of crude oil (Baussant et al., 2011; Cajaraville et al., 1992; Swedmark et al., 1973).

#### 4.2. Behavioural response of bivalve mollusks in the presence of barium, noise or turbidity with or without crude oil and bioaccumulation of PAH

To the best of our knowledge, the present report is the first to study the behavioural response of a bivalve mollusk exposed to crude oil in a multiple stress context. In addition, it was carried out under outdoor semi-natural conditions. Barium is a naturally occurring metallic trace element found in the environment, in drilling fluids and in produced waters as a by-product of the oil and gas industry. Barium is one of the major metals found in produced water at high concentrations (Neff et al., 1987, 2011). Enrichment factors of produced water compared to natural seawater can reach values up to 10,000 (Trefry et al., 1995) and frequently exceed values in the order of 1000 (Neff, 2002). With regard to toxicity, Spangenberg and Cherr (1996) found that the gastrula stage of the mussel, *Mytilus californianus*, was similarly affected by contamination with produced water or with barium. These results were in line with an earlier study by Higashi et al. (1992) in which the toxicity of different fractions of produced water were investigated in embryos of the same species. To our knowledge, there is no study describing the behaviour of adult bivalve mollusks in the presence of barium. The present study did not find any statistically significant observation concerning a behaviour change of *C. fluminea* in the presence of barium alone (10-day exposure to  $95 \pm 3.9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 7 times more than the measured natural geochemical background noise). However, in the presence of oil + barium, we report a larger valve agitation index and systematically higher concentrations of PAH in the gills, adductor muscles and foot. To explain this larger contamination status, one must keep in mind that under resting conditions the gill cavity in water breathers must be considered as an antechamber with a low inspired water turnover. This is indeed the basic mechanism allowing the haemolymph in the gills to withstand low water oxygenation levels (Massabuau and Abele, 2011), setting the stage for the low blood and tissue oxygenation strategy (Massabuau, 2001). Valve agitation in bivalve mollusks means stronger back and forth water movements between the ambient water and the pallial cavity. We propose that the increased valve agitation in clams exposed to oil + barium likely led to an increase in water renewal within the gill cavity, an increase of the contamination gradient between pallial water and the haemolymph, with or without changing the exposed gill area, which therefore facilitated the tissue contamination processes. Yet, other mechanisms could exist. For example, cadmium has been reported to promote the accumulation of the PAH benzo(a)pyrene (Benedetti et al., 2007; Wang et al., 2011), probably by altering biotransformation pathways and thus the possibility of PAH elimination by the organism (Benedetti et al., 2007). Such a mechanism could be a 2<sup>nd</sup> working hypothesis for barium.

Underwater noise pollution is responsible for adverse effects to aquatic fauna including invertebrates (for a previous discussion see de Soto, 2016). This is true for both seawater and freshwater. In the freshwaters of the Ganges River, where *Corbicula sp.* is present (Prashad, 1929), Dey et al. (2019) reported sound pressure levels ranging from 155 to 162 dB re 1  $\mu\text{Pa}$  that is above the present reported values. In the Danube River, also inhabited by *Corbicula sp.*, and in the lakes Mondsee and Traunsee, Austria, Wysocki et al. (2006) recorded similar SPL. Among the impact studies, few were carried out on bivalve mollusks despite their importance to biodiversity and their sensitivity to naturally generated sounds in the environment (Charifi et al., 2017; Eilers, 1995; Lillis et al., 2013) and to anthropogenic noise (Charifi et al., 2017; Peng et al., 2016; Roberts et al., 2015; Shi et al., 2019; Solan et al., 2016; Vazzana et al., 2016). Charifi et al. (2017) described the sense of hearing in oysters, *Magallana gigas*. The authors demonstrated the oyster hearing ability in the range from 10 to 1000 Hz through a behavioural approach based on transient valve closure reactions. In the oyster *M. gigas*, Charifi et al. (2018) studied the dual impact of cadmium (Cd) metal pollution and noise pollution (92 cargo-ship noise of 12 min per day, with a maximum SPL of 138 and 150

dBrms re 1  $\mu\text{Pa}$  for 14 days). Charifi et al. (2018) reported a decrease in valve activity, a decrease in Cd bioaccumulation and slower growth rates compared to oysters exposed to Cd alone. The authors suggested a depressant effect of “heavy” cargo ship noise on oysters (Charifi et al., 2018) that was confirmed by Shi et al. (2019) in blood clams. In the present study, clams were exposed to a less powerful noise stress, only 4–7 cargo ship noise, 16 min per day for 10 days. We did not observe any depressant effect on behaviour, and the PAH bioaccumulation of clams exposed to oil + noise did not reflect any significant difference when compared to oil alone. The exposure frequency (i.e., number of cargo ship noises per day) could be a key explanation, in addition to the possible differences in noise sensitivity between species.

The last confounding factor was turbidity episodes. Indeed, in the environment, oil and suspended particular matter (SPM) naturally aggregate. These associations are most often formed during the collision between SPM and hydrocarbons, such as PAH, in turbulent aquatic systems (Loh et al., 2018; Sun and Zheng, 2009). Loh et al. (2018) observed that despite SPM bringing PAH down in the water column, PAH accumulation by oysters was inhibited in the presence of SPM. The excretion of SPM-PAH pellets by pseudofeces was a possible hypothesis for this finding. In *C. fluminea*, the rapid and occasional adduction of valves causes ejection of water and pseudofeces through the inhaling siphon (Britton and Morton, 1982). However, within our experimental conditions, turbidity pulses did not influence the response of clams to oil and did not lead to a statistically differential accumulation of PAH by the clams exposed to oil alone compared to the clams exposed to oil + turbidity pulses. We suggest that in our experimental system the conditions were perhaps not favourable for the establishment of adhesion mechanisms between SPM and hydrocarbons. Indeed, in addition to non-chronic exposure to turbidity, adhesion mechanisms are dependent on multiple factors, such as SPM concentration, temperature, mixing energy and oil types, including the oil polar hydrocarbon fraction, which was less than 0.5 % in the present study (see review by Sun and Zheng, 2009).

#### 4.3. Behavioural ecotoxicology in bivalve mollusks and underlying physiological mechanisms

Biomonitoring as a whole allows the study of changes in water quality, but a new goal of behavioural ecotoxicology could be to evaluate the underlying disturbances in the internal medium by assessing the behaviour remotely. In the present work, we studied changes in *C. fluminea* behaviour in the presence of crude oil. The hourly valve-closure duration of *C. fluminea* exposed to oil was longer than in unexposed animals. This indicates an increase in the adductor muscle catch-state. In bivalves, catch is a passive state of smooth muscle that leads to the maintenance of valve closure (i.e., stretch resistance) for long time periods with minimal energy consumption (Galler, 2008; Yamada et al., 2013). It is regulated by the phosphorylation and dephosphorylation of twitchin (Funabara et al., 2003). When smooth muscle is relaxed (i.e., when the valves are not closed), twitchin is phosphorylated. The contraction (i.e., valves closure) is caused by the release of acetylcholine, which leads to an increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. When the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration becomes high, twitchin is dephosphorylated by a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phosphatase, and the catch state is initiated. The catch state is stopped by the release of serotonin, which causes an increase in intracellular cAMP and cAMP-dependent protein kinase A, which in turn leads to the phosphorylation of twitchin (Funabara et al., 2006; Twarog, 1954, 1960). Thus, the presently recorded increase in catch state also reflects an internal change of status in the serotonergic and cholinergic systems. This is supported by the observations by Cappello et al. (2015) and Maisano et al. (2017). They reported a decrease in acetylcholine and serotonin neurotransmitters in gills of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* encaged in the field and subjected to petrochemical activities. Interestingly, Hansen et al. (2017) also found a decrease in activity and a reduction of the

neurotransmitter acetylcholine in the copepod *Calanus finmarchicus* in response to sublethal exposure to oil. Finally, the present decrease in valve closure duration fits well with a narcotic effect, which should also be present. Narcosis is defined as a nonspecific and reversible disruption of the functioning of biological membranes caused by the accumulation of hydrophobic compounds, such as PAH, which causes an overall decrease in activity (van Wezel and Opperhuizen, 1995).

To conclude, the present study supports the interest of studying and using the behaviour of bivalve mollusks to follow global water quality in the field. This is especially true in the context of operational biomonitoring in the oil industry (Andrade et al., 2016; Blanc et al., 2017; Massabuau et al., 2015). The changes of behaviour in the presence of crude oil in water were reproducible and were not influenced by the other environmentally relevant stressors studied here: noise pollution, turbidity pulses, barium concentration and water temperature. In the future, the response pattern to crude oil should be studied in other bivalve species, comparing freshwater and seawater, and at different contamination pressures. However, the literature shows that the present results and analysis are already quite coherent.

### Funding

This paper is the result of an ongoing collaboration between the UMR CNRS 5805 EPOC (University of Bordeaux and CNRS) and TOTAL, aiming to develop HFNI valvometry as a reliable technique applicable in the oil and gas industry, both offshore, along the coastline and in freshwaters. The TOTAL Company personnel participated in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report and in the decision to submit the article for publication. Financial support has been received through the CNRS, the University of Bordeaux, the Region Nouvelle Aquitaine and TOTAL (Project number: Ref TOTAL, FR00008208; AST, Aquitaine Science Transfert, AST 2015-336).

### CRediT authorship contribution statement

**A. Miserazzi:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **M. Sow:** Data curation, Formal analysis, Software, Supervision, Validation, Visualization. **C. Gelber:** Investigation, Methodology, Validation. **M. Charifi:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Validation. **P. Ciret:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Supervision, Validation. **J.M. Dalens:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Validation. **C. Weber:** Formal analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Validation. **S. Le Floch:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Supervision, Validation. **C. Lacroix:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Validation. **P. Blanc:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **J.C. Massabuau:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing.

### Declaration of Competing Interest

None.

### Acknowledgments

The authors wish to thank B. Etcheverria for the bivalve care and clam samples, M. Perrigault for dissections and helpful discussions, and R. Maury-Brachet and P.-Y. Gourves for barium analysis.

### References

- Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral disturbances: the missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15, 87–110. <https://doi.org/10.1080/10807030802615543>.
- 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.* <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00187>.
- Bassères, A., Simonet, F., Lafont, M., Coste, M., Narbonne, J.F., 2004. Validation of biomarkers for impact evaluation of aqueous industrial waste in mesocosms. *Water Sci. Technol.* 49, 123–130.
- Bassères, A., Tramier, B., 2001. Characterisation of the impact of aqueous industrial waste in mesocosms: biological indicators and pilot streams. *Water Sci. Technol.* 44, 135–143. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0763>.
- Baussant, T., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., Bechmann, R.K., Taban, I.C., Sanni, S., 2011. Effects of chronic exposure to dispersed oil on selected reproductive processes in adult blue mussels (*Mytilus edulis*) and the consequences for the early life stages of their larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1437–1445. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.029>.
- Benedetti, M., Martuccio, G., Fattorini, D., Canapa, A., Barucca, M., Nigro, M., Regoli, F., 2007. Oxidative and modulatory effects of trace metals on metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Aquat. Toxicol.* 85, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.08.009>.
- Blanc, P., Ducastel, B., Cazin, J., Al Blooshi, M., Al Dhaheri, S.S., Al, Ali, Marzooqi, M., Maneux, E., Ciret, P., Sow, M., Massabuau, J.C., 2017. First-time implementation of innovative in situ biotechnology on an offshore platform in Arabian Gulf for continuous water quality monitoring and early leak detection. *Old Spe J.* <https://doi.org/10.2118/188821-MS>.
- Borja, A., 2014. Grand challenges in marine ecosystems ecology. *Front. Mar. Sci.* 1. <https://doi.org/10.3389/fmars.2014.00001>.
- Britton, J.C., Morton, B., 1982. *A Dissection Guide, Field and Laboratory Manual for the Introduced Bivalve Corbicula fluminea*.
- Cailleaud, K., Bassères, A., Gelber, C., Postma, J.F., Schure ter, A.T.M., Leonards, P.E.G., Redman, A.D., Whale, G.F., Spence, M.J., Hjort, M., 2019. Investigating predictive tools for refinery effluent hazard assessment using stream mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 38 (3), 650–659. <https://doi.org/10.1002/etc.4338>.
- Cajaraville, M.P., Marigómez, J.A., Angulo, E., 1992. Comparative effects of the water accommodated fraction of three oils on mussels. 1. Survival, growth and gonad development. *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol. Toxicol.* 102, 103–112.
- Cappello, T., Maisano, M., Giannetto, A., Parrino, V., Mauceci, A., Fasulo, S., 2015. Neurotoxicological effects on marine mussel *Mytilus galloprovincialis* caged at petrochemical contaminated areas (eastern Sicily, Italy): 1H NMR and immunohistochemical assays. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 169, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.12.006>.
- Charifi, M., Miserazzi, A., Sow, M., Perrigault, M., Gonzalez, P., Ciret, P., Benomar, S., Massabuau, J.-C., 2018. Noise pollution limits metal bioaccumulation and growth rate in a filter feeder, the Pacific oyster *Magallana gigas*. *PLoS One* 13, e0194174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194174>.
- Charifi, M., Sow, M., Ciret, P., Benomar, S., Massabuau, J.-C., 2017. The sense of hearing in the Pacific oyster, *Magallana gigas*. *PLoS One* 12, e0185353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185353>.
- Danovaro, R., Carugati, L., Berzano, M., Cahill, A.E., Carvalho, S., Chenuil, A., Corinaldesi, C., Cristina, S., David, R., Dell'Anno, A., Dzhenbekova, N., Garcés, E., Gasol, J.M., Goela, P., Féral, J.-P., Ferrera, I., Forster, R.M., Kurekin, A.A., Rastelli, E., Marinova, V., Miller, P.I., Moncheva, S., Newton, A., Pearman, J.K., Pitois, S.G., Reñé, A., Rodríguez-Ezpeleta, N., Saggiomo, V., Simis, S.G.H., Stefanova, K., Wilson, C., Lo Martire, M., Greco, S., Cochrane, S.K.J., Mangoni, O., Borja, A., 2016. Implementing and innovating marine monitoring approaches for assessing marine environmental status. *Front. Mar. Sci.* 3. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00213>.
- de Soto, N.A., 2016. Peer-reviewed studies on the effects of anthropogenic noise on marine invertebrates: from scallop larvae to giant squid. In: Popper, A.N., Hawkins, A. (Eds.), *The Effects of Noise on Aquatic Life II, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, New York, pp. 17–26.
- Dey, M., Krishanaswamy, J., Morisaka, T., Kelkar, N., 2019. Interacting effects of vessel noise and shallow river depth elevate metabolic stress in Ganges river dolphins. *Sci. Rep.* 9, 15426. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51664-1>.
- Dragsund, I., Kompen, M., Holmslet, E., Sønneland, E., Christie, O., 2013. The Biota Guard marine oil leak monitoring system—novel sampling application of bivalve PAT biosensors. *Tos Forum* 2013, 15. <https://doi.org/10.1255/tosf.6>.
- Ellers, O., 1995. Discrimination among wave-generated sounds by a swash-riding clam. *Biol. Bull.* 189, 128–137. <https://doi.org/10.2307/1542463>.
- Funabara, D., Kanoh, S., Siegmán, M.J., Butler, T.M., Hartshorne, D.J., Watabe, S., 2006. Twitchin as a regulator of catch contraction in molluscan smooth muscle. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 26, 455–460. <https://doi.org/10.1007/s10974-005-9029-2>.
- Funabara, D., Watabe, S., Mooers, S.U., Narayan, S., Dudas, C., Hartshorne, D.J., Siegmán, M.J., Butler, T.M., 2003. Twitchin from Molluscan Catch Muscle. Primary structure and relationship between site-specific phosphorylation and mechanical function. *J. Biol. Chem.* 278, 29308–29316. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303272200>.
- Galler, S., 2008. Molecular basis of the catch state in molluscan smooth muscles: a catchy challenge. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 29, 73. <https://doi.org/10.1007/s10974-008-9149-6>.
- García-March, J.R., Jiménez, S., Sanchis, M.A., Monleon, S., Lees, J., Surge, D., Tena-Medialdea, J., 2016. In situ biomonitoring shows seasonal patterns and

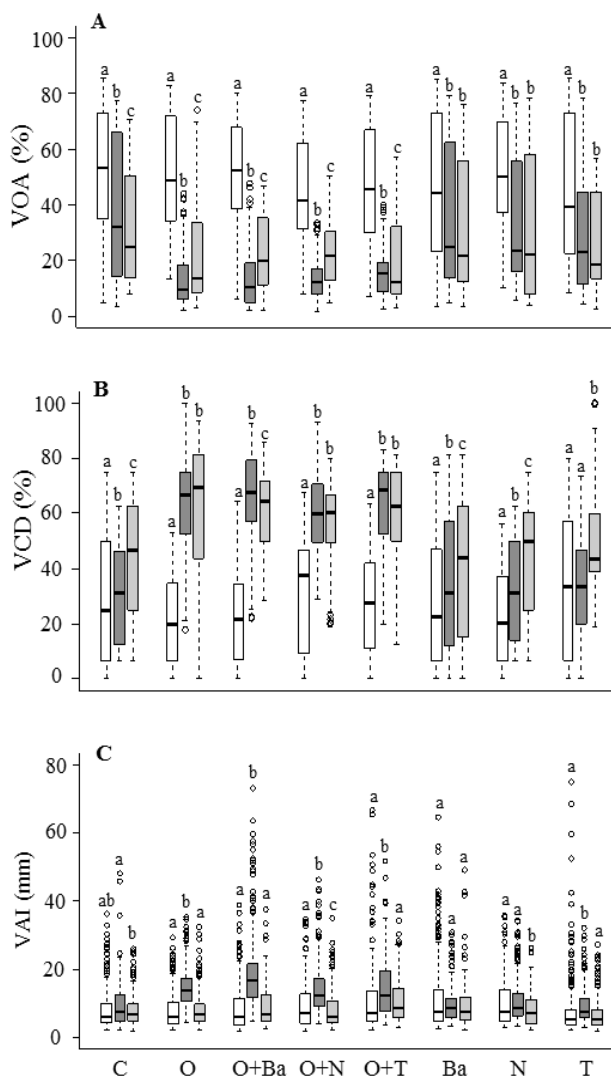


- environmentally mediated gaping activity in the bivalve, *Pinna nobilis*. Mar. Biol. 163. <https://doi.org/10.1007/s00227-016-2812-3>.
- Gerhardt, A., 2007. Aquatic behavioral ecotoxicology—prospects and limitations. Hum. Ecol. Risk Assess. 13, 481–491. <https://doi.org/10.1080/10807030701340839>.
- Guo, X., Feng, C., 2018. Biological toxicity response of Asian Clam (*Corbicula fluminea*) to pollutants in surface water and sediment. Sci. Total Environ. 631–632, 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.019>.
- Hansen, B.H., Altin, D., Nordtug, T., Øverjordet, I.B., Olsen, A.J., Krause, D., Størdal, I., Størseth, T.R., 2017. Exposure to crude oil micro-droplets causes reduced food uptake in copepods associated with alteration in their metabolic profiles. Aquat. Toxicol. 184, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.01.007>.
- Hartmann, J.T., Beggel, S., Auerswald, K., Stoeckle, B.C., Geist, J., 2016. Establishing mussel behavior as a biomarker in ecotoxicology. Aquat. Toxicol. 170, 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.06.014>.
- Hartwick, E.B., Wu, R.S.S., Parker, D.B., 1982. Effects of a crude oil and an oil dispersant (Corexit 9527) on populations of the littleneck clam (*Protothaca staminea*). Mar. Environ. Res. 6, 291–306. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(82\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0141-1136(82)90043-5).
- Higashi, R., Cherr, G.N., Bergens, C., Fan, T.W.-M., 1992. An approach to toxicant isolation from a produced water source in the Santa Barbara Channel. In: Ray, J.P., Englehardt, F.R. (Eds.), Produced Water: Technological/Environmental Issues and Solutions. Plenum, New York, NY, USA, pp. 223–234.
- Kramer, K.J.M., Jenner, H.A., de Zwart, D., 1989. The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. Hydrobiologia 188–189, 433–443. <https://doi.org/10.1007/BF00027811>.
- Lacroix, C., Le Cuff, N., Receveur, J., Moraga, D., Auffret, M., Guyomarch, J., 2014. Development of an innovative and “green” stir bar sorptive extraction—thermal desorption—gas chromatography—tandem mass spectrometry method for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota. J. Chromatogr. A 1349, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.094>.
- Lillis, A., Eggleston, D.B., Bohnenstiehl, D.R., 2013. Oyster larvae settle in response to habitat-associated underwater sounds. PLoS One 8, e79337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079337>.
- Loh, A., Yim, U.H., Ha, S.Y., An, J.G., 2018. A preliminary study on the role of suspended particulate matter in the bioavailability of oil-derived polycyclic aromatic hydrocarbons to oysters. Sci. Total Environ. 643, 1084–1090. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.129>.
- Maisano, M., Cappello, T., Natalotto, A., Vitale, V., Parrino, V., Giannetto, A., Oliva, S., Mancini, G., Cappello, S., Mauceri, A., Fasulo, S., 2017. Effects of petrochemical contamination on caged marine mussels using a multi-biomarker approach: histological changes, neurotoxicity and hypoxic stress. Mar. Environ. Res. 128, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.03.008>.
- Massabuau, J.-C., Abele, D., 2011. Principles of oxygen uptake and tissue oxygenation in water-breathing animals. Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 139–156.
- Massabuau, J.-C., 2001. From low arterial- to low tissue-oxygenation strategy. An evolutionary theory. Respir. Physiol. 128, 249–261. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(01\)00305-X](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(01)00305-X).
- Massabuau, J.-C., Gudimov, A., Blanc, P., 2015. Environmental monitoring of arctic waters with unmanned bivalve biosensor technology: one year of background data acquisition in the Barents Sea. Presented at the SPE Russian Petroleum Technology Conference, Society of Petroleum Engineers. <https://doi.org/10.2118/176681-MS>.
- Melvin, S.D., Wilson, S.P., 2013. The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: a meta-analysis. Chemosphere 93, 2217–2223. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.036>.
- Miller, L.P., Dowd, W.W., 2017. Multimodal *in situ* datalogging quantifies inter-individual variation in thermal experience and persistent origin effects on gaping behavior among intertidal mussels (*Mytilus californianus*). J. Exp. Biol. 220, 4305–4319. <https://doi.org/10.1242/jeb.164020>.
- Neff, J., 2002. Chapter 4. Barium in the Ocean. <https://doi.org/10.1016/B978-008043716-3/50005-1>.
- Neff, J., Lee, K., DeBlois, E.M., 2011. Produced Water: overview of composition, fates, and effects. In: Lee, K., Neff, J. (Eds.), Produced Water. Springer, New York, New York, NY, pp. 3–54. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0046-2-1>.
- Neff, J.M., Rabalais, N.N., Boesch, D.F., 1987. Offshore oil and gas development activities potentially causing long-term environmental effects. In: Boesch, D.F., Rabalais, N.N. (Eds.), Long-Term Effects of Offshore Oil and Gas Development. Elsevier Applied Science Publishers, London, pp. 149–174.
- Parker, M.O., 2016. Adult vertebrate behavioural aquatic toxicology: reliability and validity. Aquat. Toxicol. 170, 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.001>.
- Peng, C., Zhao, X., Liu, S., Shi, W., Han, Y., Guo, C., Jiang, J., Wan, H., Shen, T., Liu, G., 2016. Effects of anthropogenic sound on digging behavior, metabolism, Ca(2+)/Mg(2+) ATPase activity, and metabolism-related gene expression of the bivalve *Sinonovacula constricta*. Sci. Rep. 6, 24266. <https://doi.org/10.1038/srep24266>.
- Pohlert, T., 2014. The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR). R Package. URL: <http://CRAN.R-project.org/package=PMCMR>.
- Prashad, B., 1929. Revision of the asiatic species of the genus *Corbicula*. Iii. The species of the genus *Corbicula* from China, South-Eastern Russia, Tibet, Formosa, and the Philippine Islands. Memoirs of the Indian Museum 9 (2), 49–68.
- Pyle, G., Ford, A.T., 2017. Behaviour revised: contaminant effects on aquatic animal behaviour. Aquat. Toxicol. 182, 226–228. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.11.008>.
- Queirós, A.M., Strong, J.A., Mazik, K., Carstensen, J., Bruun, J., Somerfield, P.J., Bruhn, A., Ciavatta, S., Flo, E., Bizsel, N., Özyaydinli, M., Chuševič, R., Muxika, I., Nygård, H., Papadopoulou, N., Pantazi, M., Krause-Jensen, D., 2016. An objective framework to test the quality of candidate indicators of good environmental status. Front. Mar. Sci. 3. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00073>.
- R Core Team, 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. URL: R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Redmond, K.J., Berry, M., Pampanin, D.M., Andersen, O.K., 2017. Valve gape behaviour of mussels (*Mytilus edulis*) exposed to dispersed crude oil as an environmental monitoring endpoint. Mar. Pollut. Bull. 117, 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.02.005>.
- Roberts, L., Cheesman, S., Breithaupt, T., Elliott, M., 2015. Sensitivity of the mussel *Mytilus edulis* to substrateborne vibration in relation to anthropogenically generated noise. Mar. Ecol. Prog. Ser. 538, 185–195. <https://doi.org/10.3354/meps11468>.
- Saaristo, M., Brodin, T., Balshine, S., Bertram, M.G., Brooks, B.W., Ehlmann, S.M., McCallum, E.S., Sih, A., Sundin, J., Wong, B.B.M., Arnold, K.E., 2018. Direct and indirect effects of chemical contaminants on the behaviour, ecology and evolution of wildlife. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 285, 20181297. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1297>.
- Shi, W., Han, Y., Guan, X., Rong, J., Du, X., Zha, S., Tang, Y., Liu, G., 2019. Anthropogenic noise aggravates the toxicity of cadmium on some physiological characteristics of the blood clam *tegillarca granosa*. Front. Physiol. 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00377>.
- Shrivastava, A., Gupta, V.B., 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. Chron. Young Sci. 2, 21. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>.
- Solan, M., Hauton, C., Godbold, J.A., Wood, C.L., Leighton, T.G., White, P., 2016. Anthropogenic sources of underwater sound can modify how sediment-dwelling invertebrates mediate ecosystem properties. Sci. Rep. 6. <https://doi.org/10.1038/srep20540>.
- Sourisseau, S., Bassères, A., Périé, F., Caquet, T., 2008. Calibration, validation and sensitivity analysis of an ecosystem model applied to artificial streams. Water Res. 42, 1167–1181. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.08.039>.
- Spangenberg, J.V., Cherr, G.N., 1996. Developmental effects of barium exposure in a marine bivalve (*Mytilus californianus*). Environ. Toxicol. Chem. 15, 1769–1774. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(1996\)015<1769:DEOBEI>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1996)015<1769:DEOBEI>2.3.CO;2).
- Stainken, D.M., 1976. The effect of a No. 2 fuel oil and a South Louisiana crude oil on the behavior of the soft shell clam, *Mya arenaria* L. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 16, 724–729. <https://doi.org/10.1007/BF01685580>.
- Sun, J., Zheng, X., 2009. A review of oil-suspended particulate matter aggregation - a natural process of cleansing spilled oil in the aquatic environment. J. Environ. Monit. 11, 1801–1809. <https://doi.org/10.1039/b904829b>.
- Swedmark, M., Granmo, Å., Kollberg, S., 1973. Effects of oil dispersants and oil emulsions on marine animals. Water Res. 7, 1649–1672. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(73\)90134-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(73)90134-6).
- 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. Environ. Toxicol. Chem. 22, 914–920. <https://doi.org/10.1002/etc.5620220432>.
- Trefry, J.H., Naito, K.L., Trocine, R.P., Metz, S., 1995. Distribution and Bioaccumulation of Heavy Metals from Produced Water Discharges to the Gulf of Mexico 6.
- Twarog, B.M., 1954. Responses of a molluscan smooth muscle to acetylcholine and 5-hydroxytryptamine. J. Cell. Comp. Physiol. 44, 141–163. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030440112>.
- Twarog, B.M., 1960. Effects of acetylcholine and 5-hydroxytryptamine on the contraction of a molluscan smooth muscle. J. Physiol. (Lond.) 152, 236–242.
- van Wezel, A.P., Opperhuizen, A., 1995. Narcosis due to environmental pollutants in aquatic organisms: residue-based toxicity, mechanisms, and membrane burdens. Crit. Rev. Toxicol. 25, 255–279. <https://doi.org/10.3109/10408449509089890>.
- Vazzana, M., Celi, M., Maricchiolo, G., Genovese, L., Corrias, V., Quinci, E.M., de Vincenzi, G., Maccarrone, V., Cammilleri, G., Mazzola, S., Buscaino, G., Filicetto, F., 2016. Are mussels able to distinguish underwater sounds? Assessment of the reactions of *Mytilus galloprovincialis* after exposure to lab-generated acoustic signals. Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol. 201, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.029>.
- Wang, L., Pan, L., Liu, N., Liu, D., Xu, C., Miao, J., 2011. Biomarkers and bioaccumulation of clam *Ruditapes philippinarum* in response to combined cadmium and benzo[a]pyrene exposure. Food Chem. Toxicol. 49, 3407–3417. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.015>.
- Yamada, A., Yoshio, M., Oiwa, K., 2013. Myosin Mg-ATPase of molluscan muscles is slightly activated by F-actin under catch state *in vitro*. J. Muscle Res. Cell. Motil. 34, 115–123. <https://doi.org/10.1007/s10974-013-9339-8>.
- Wysocki, L.E., Dittami, J.P., Ladich, F., 2006. Ship noise and cortisol secretion in European freshwater fishes. Biol. Conserv. 128, 501–508.

## Résultats annexes (1)

### Comparaison de l'activité valvaire entre périodes.

Afin d'élargir l'analyse des résultats, il est brièvement proposé ici une comparaison du comportement des corbicules entre les périodes (Référence, Exposition, Post-exposition), indépendamment pour chaque condition (Fig. 5.1) Dans la condition contrôle (C), l'amplitude d'ouverture a diminué et la durée de fermeture a augmenté entre la période de référence et la période d'exposition ainsi qu'entre la période d'exposition et la période de post-exposition (Fig. 5.1.A et 5.1.B). L'évolution du comportement entre les périodes est similaire pour les conditions C, Ba, N et T. En présence de pétrole seul ou additionné de bruit, baryum ou turbidité, une diminution de l'amplitude d'ouverture et une augmentation des durées de fermeture ont également été observées entre les périodes de référence et les périodes d'exposition, mais de façon nettement plus marquée qu'en absence de pétrole. En ce qui concerne la comparaison entre la période d'exposition et la période de post-exposition, il est à noter une légère augmentation de l'amplitude d'ouverture des corbicules exposés au pétrole, pétrole + baryum et pétrole + pollution sonore qui pourraient témoigner d'un début de rétablissement du comportement. En ce qui concerne l'indice d'agitation des valves (Fig. 5.1.C), on retrouve de façon cohérente avec les résultats précédemment présentés, une augmentation plus nette et homogène chez les corbicules exposés au pétrole brut seul ou en mélange.



**Figure. 5.1 Behavioral comparison between periods.** (A) Mean hourly valve-amplitude (%), (B) mean hourly valve closure-duration and (C) mean hourly valve agitation index (mm) for 14-16 clams during the reference period (white), exposure period (dark grey) and post-exposure period (light grey) for each artificial stream (C, control; O, oil; O + Ba; oil and barium; O+N, oil and noise pollution; O+T, oil and turbidity pulses; Ba, barium; N, noise pollution; T, turbidity pulses). Boxplot (n = 240 values; 24 h x 10 days). Different letters indicate significant differences, independently for each artificial streams (p < 0.05; Pairwise Wilcoxon Test with Holm adjustment).

## Résultats annexes (2)

**Effet de la turbidité sur l'activité valvaire.** Durant les épisodes de turbidité, un comportement valvaire spécifique a été mis en évidence pour environ 40 % des corbicules ouverts. Ce comportement spécifique se traduit par l'augmentation marquée et transitoire de l'agitation des valves et notamment du nombre de leurs micro-contractions. Cette agitation était parfois associée à la modification de l'écartement des valves. La Figure 5.2 présente une réponse caractéristique observée uniquement en présence de turbidité.

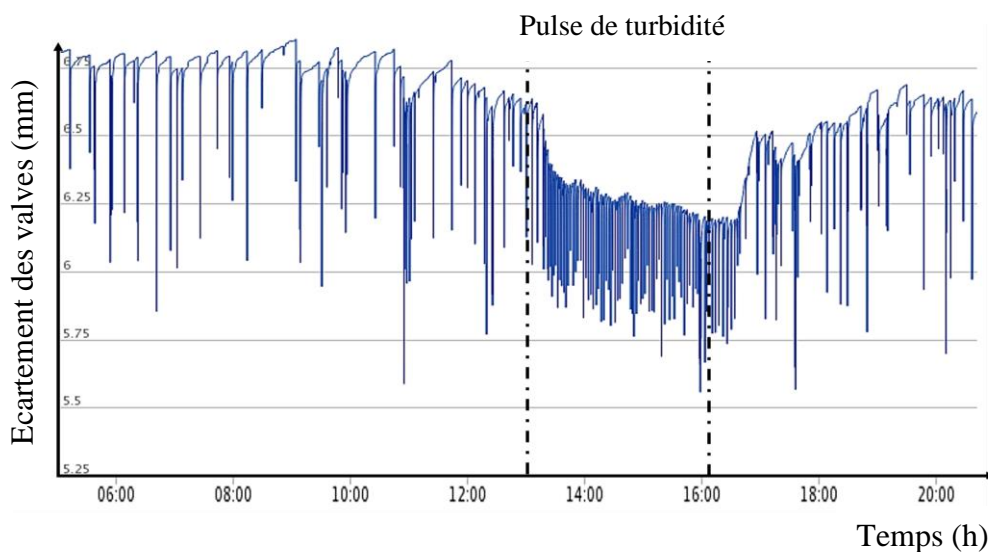


Figure 5.2. Exemple typique de l'activité valvaire d'un corbicule (animal n° 3, le 7 juin), avant, pendant et après un pulse de turbidité ( $\approx 200$  NTU). Le lancement de la turbidité à 13 h (en tête de rivière, 20 m en amont des corbicules) et son arrêt à 16 h 10 min sont symbolisés par les lignes noires en pointillé. La modification de l'activité valvaire débute 19 min après le lancement de l'injection en tête de rivière. Elle se maintient durant les 29 min suivant l'arrêt de l'injection en tête de rivière. Visuellement, le panache de turbidité était arrivé au niveau des corbicules en 10 - 15 min.

Cette réponse comportementale a été retrouvée au cours des deux expérimentations réalisées aux Rivières Pilotes (Lacq, Pyrénées-Atlantiques). L'une a été réalisée en mai – juillet 2016 (résultats non présentés) et l'autre en octobre 2016 – janvier 2017. La réponse comportementale à la turbidité s'est donc avérée reproductible dans le temps, indépendante de la saison (printemps vs hiver) et de la température de l'eau ( $14 - 20$  °C en mai-juillet vs  $12,5 - 7,5$  °C en octobre-janvier). Les valeurs de turbidité testées étaient comprises dans la gamme  $100 - 300$  NTU. Ces observations ont été faites uniquement lors de l'exposition des corbicules aux pulses de turbidité, avec ou sans addition de pétrole brut. Différents exemples de la réponse comportementale caractéristique sont présentés ci-dessous (Fig. 5.3).

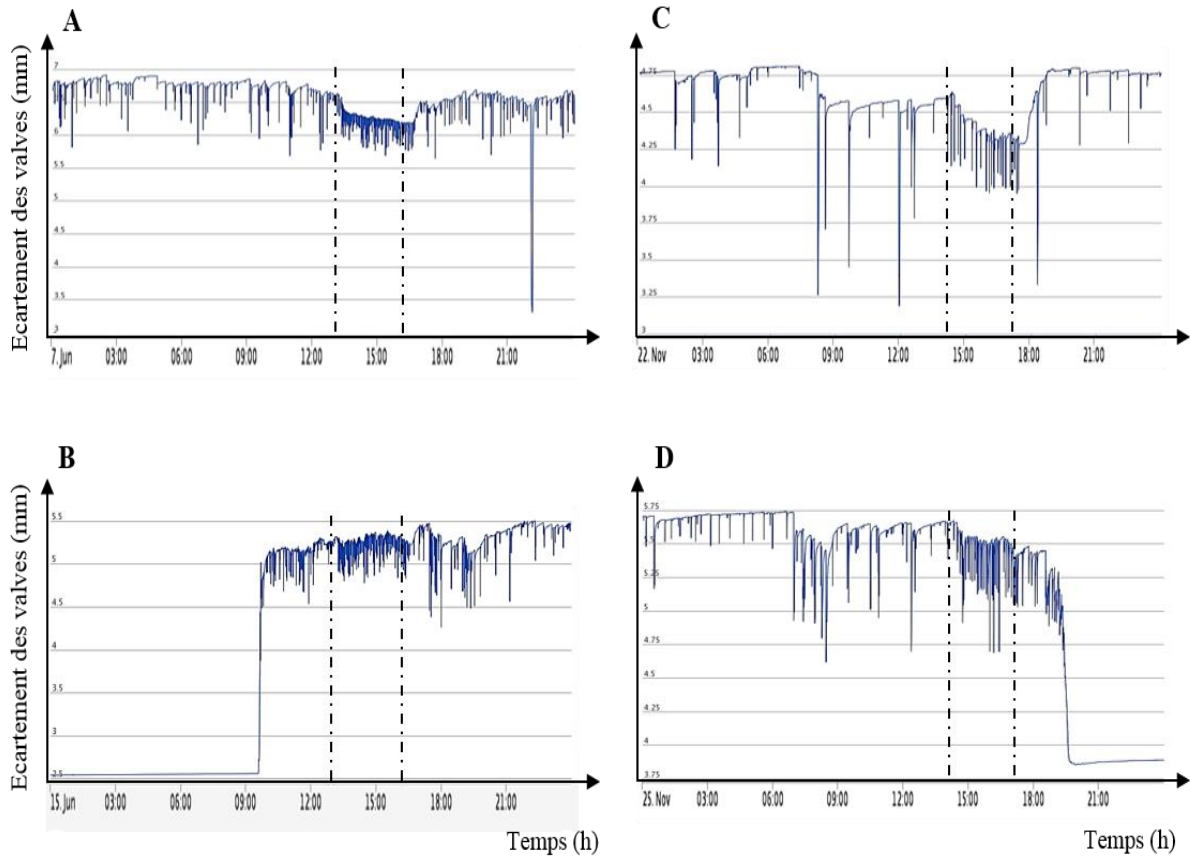


Figure 5.3. Exemple de l'activité valvaire de quatre corbicules sur une période de 24 h : avant, pendant et après un pulse de turbidité quel que soit la saison et la température de l'eau. Le lancement de la turbidité (en tête de rivière, 20 m en amont des corbicules) et son arrêt sont symbolisés par les lignes noires en pointillé. Visuellement, le panache de turbidité initié en tête de rivière arrive au niveau des corbicules (soit 20 m après la zone d'injection) en 10 à 15 min. (A) Activité valvaire d'un corbicule (n° 3) avant, pendant et après un pulse de turbidité à  $\approx 200$  NTU le 7 juin 2016 (13 h – 16 h 10). (B) Activité valvaire d'un corbicule (n° 12) avant, pendant et après un pulse de turbidité à  $\approx 150$  NTU le 15 juin 2016 (13 h – 17 h). (C) Activité valvaire d'un corbicule (n° 7) avant, pendant et après un pulse de turbidité à  $\approx 200$  NTU le 22 novembre 2016 (14 h – 17 h). (D) Activité valvaire d'un corbicule (n° 2) avant, pendant et après un pulse de turbidité à  $\approx 250$  NTU le 25 novembre 2016 (14 h – 17 h).

## **5.3 Perturbations comportementales et contamination de l'huitre *M. gigas* exposée au pétrole brut en conditions multistress de laboratoire**

Cette partie est destinée à être rédigée comme article qui sera publié dans un journal international de rang A.

### **5.3.1 Introduction**

Dans la partie précédente, nous avons exposé des corbicules au pétrole brut seul ou en conditions multistress dans un contexte semi-naturel. La concentration de pétrole brut a été maintenue constante durant les 10 jours d'exposition (concentration nominale,  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; concentration mesurée,  $167 \pm 28 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). À cette concentration constante, la réponse comportementale des corbicules a été caractérisée par l'évolution de trois paramètres clés : la diminution de l'amplitude d'écartement des valves (VOA), l'augmentation des durées de fermeture (VCD) et l'augmentation de l'indice d'agitation des valves (agitation pondérée, VAI). Cette réponse comportementale marquée au pétrole brut n'a pas été perturbée par l'exposition simultanée des corbicules à des stress additionnels à concentration ou pression écologiquement réalistes (baryum, pulses de turbidité, pollution sonore « légère »). Dans cette partie, nous avons cherché à caractériser la réponse comportementale d'un bivalve marin, l'huitre *M. gigas*, exposé à une concentration variable de pétrole brut dans des conditions contrôlées de laboratoire afin de (i) s'assurer de la cohérence des réponses comportementales d'un bivalve marin par comparaison avec celles observées chez les corbicules dulçaquicoles, (ii) suivre l'évolution du comportement dans un milieu à concentration variable et (iii), continuer à explorer les interférences potentielles avec deux autres facteurs de stress que sont l'hypoxie profonde et la pollution sonore « sévère ». De plus, en conditions multistress, nous avons choisi de préalablement exposer les huitres à la pollution sonore et à l'hypoxie afin de renforcer l'effet potentiellement confondant de ces facteurs de stress sur la réponse comportementale des huitres face au pétrole brut. Le choix d'une hypoxie avec une  $\text{PO}_2$  de 2-3 kPa a été guidé par notre connaissance de cas de plateformes dans le Golfe Arabo-Persique où l'on parle d'eaux très désoxygénées près du

fond (TOTAL, communications personnelles). En ce qui concerne la pollution sonore, le même protocole expérimental que celui du Chapitre 4 a été utilisé. Comme chez les corbicules, nous avons complété les réponses comportementales des huitres par des dosages de HAP dans leur tissu. Le design expérimental ainsi que des conditions d'exposition et protocoles associés sont présentés dans le Chapitre 3 (§ 3.2.2 ; expérimentation en conditions de laboratoire n° 2).

## 5.3.2 Résultats & Discussion

### 5.3.2.1 Cinétique de contamination

Afin de déterminer *a posteriori* les concentrations d'exposition des huitres, des analyses de HAP dans l'eau de chaque unité expérimentale (UE) ont été réalisées à différents temps clés en fonction de la cinétique de contamination par le pétrole brut (Fig. 5.3.1). Les dosages de HAP dans l'eau réalisés par le Cedre ont été obtenus par GC-MS et validés par l'analyse d'échantillons certifiés (NIST SRM 2779, Gulf of Mexico Crude Oil) et de blancs analytiques. Les résultats des dosages montrent une bonne reproductibilité entre les conditions d'exposition (O, Oil, Pétrole seul ; OH, Oil + Hypoxia, Pétrole + Hypoxie ; ON, Oil + Noise, Pétrole + Pollution sonore) et entre les répliques (1 et 2). En parallèle, on observe également une contamination des UE contrôles (CRTL1 et CRTL2) qui semble être fonction des concentrations d'exposition au sein des autres conditions. Par ailleurs, l'évolution des concentrations en HAP dosés est cohérente avec la cinétique de contamination par le pétrole brut. En tenant compte de l'ensemble de ces données, deux périodes d'exposition au pétrole brut ont été définies pour l'étude du comportement des huitres. Durant la **période d'exposition n° 1** (E1, Fig. 5.3.1A) d'une durée de 74 h, les huitres ont été exposées à des concentrations nominales de pétrole brut de  $390 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (durant les 49 premières heures) puis de  $750 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (durant les 25 h qui suivent). Au cours de cette période, les concentrations mesurées en HAP étaient de  $121,7 \pm 20,2 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (P1, Fig. 5.3.1) puis de  $174,7 \pm 3,4 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (P2, Fig. 5.3.1) dans O1 et O2 (Oil seul) ; de  $137,6 \pm 19,0 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (P1, Fig. 5.3.1) puis de  $140,4 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (P2, Fig. 5.3.1) dans OH1 et/ou OH2 (Oil + Hypoxia) ; de  $131,9 \pm 20,7 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (P1, Fig. 5.3.1) puis de  $148,7 \pm 14,3 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (P2, Fig. 5.3.1) dans ON1 et ON2 (Oil + Noise). Durant la **période d'exposition n° 2** (E2, Fig. 5.3.1A) d'une durée de 65 h, les huitres ont

été exposées à une concentration nominale de pétrole brut de 2800  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Les concentrations mesurées en HAP au cours étaient de  $1933,3 \pm 65,4 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (P3, Fig. 5.3.1), puis de  $4276,9 \pm 174 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (P4, Fig. 5.3.1) et enfin de  $3914,9 \pm 759,9 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (P5, Fig. 5.3.1) dans O1 et O2. Dans OH1 et OH2, les concentrations mesurées étaient de  $2000,8 \pm 79,9 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (P3, Fig. 5.3.1), puis de  $4358 \pm 187,3 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (P4, Fig. 5.3.1) et enfin de  $3537,9 \pm 177,8 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (P5, Fig. 5.3.1). Dans ON1 et ON2, les concentrations mesurées étaient de  $2526,2 \pm 384,3 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (P3, Fig. 5.3.1), puis de  $4382 \pm 307,6 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (P4, Fig. 5.3.1) et enfin de  $3684,2 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (P5, Fig. 5.3.1). En comparaison de la littérature, ces valeurs d'exposition sont dans la gamme des valeurs environnementales écologiquement réalistes. Plus précisément, les concentrations en HAP mesurées lors de la période E1 sont dans la gamme faible voire très faible des concentrations recensées dans le milieu naturel alors que les concentrations mesurées durant la période E2 sont des valeurs plutôt moyennes. En effet, Sousa et al. (2018) qui ont réalisé une méta-analyse de la littérature mondiale, ont reporté des concentrations moyennes de l'ordre de  $4500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . Sur les côtes françaises, Guéguen et al. (2011) ont recensé des concentrations en HAP dans l'eau comprises entre 0 et  $8500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . Enfin, Incardona et al. (2014) considèrent par exemple que des concentrations environnementales réalistes en HAP totaux dans l'eau sont comprises entre 1000 et  $15\ 000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Au cours de notre expérimentation, aucune mortalité n'a été observée durant l'intégralité des périodes d'exposition. Seulement deux huitres sont mortes (sur les 128 utilisées) durant la période d'acclimatation.

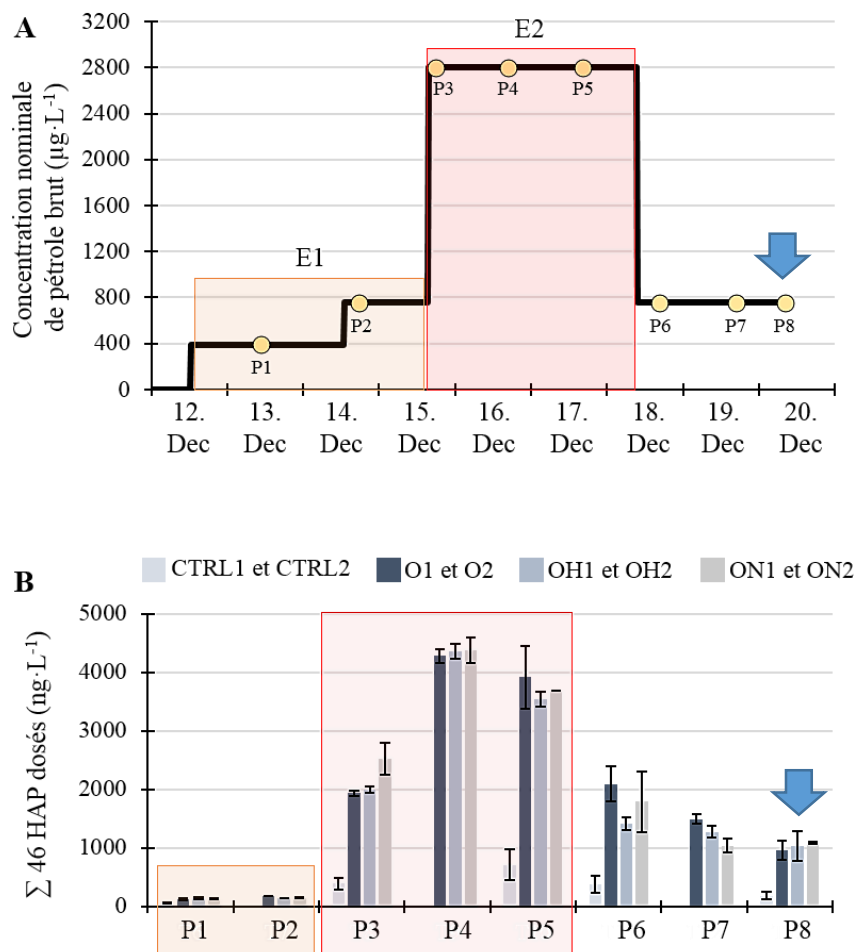


Figure 5.3.1. Cinétique de contamination des unités expérimentales (UE). (A) La courbe en noir représente l'évolution théorique de la concentration nominale de pétrole brut injectée (exprimée en  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) dans les UE en fonction du temps. Les points jaunes représentent les temps d'échantillonnage d'eau (P1, Prélèvement n° 1 ; P2, Prélèvement n°2, etc). Pour les analyses comportementales, deux périodes ont été définies en fonction des concentrations de pétrole brut injecté : la période d'exposition n°1 (E1) représentée sur fond orange et la période d'exposition n°2 (E2) représentée sur fond rouge. (B) Concentrations en HAP dans l'eau (somme de 21 HAP parents et de 25 familles de HAP alkylés, exprimée en  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en fonction des prélèvements et en fonction des conditions expérimentales. Moyennes des répliques (1 et 2)  $\pm$  1 écart-type sauf pour P2 OH et P5 ON. Les analyses dans la condition CTRL n'ont pas été réalisées à P2, P4 et P7. Les huitres pour les analyses d'HAP et de protéomique ont été prélevés à P8 (flèches bleues).



### 5.3.2.2 Réponses comportementales des huitres en présence de pétrole seul

Au cours de cette étude, les analyses comportementales ont été présentées pour chaque groupe d'huitre (i.e. dans chaque UE) sur une période de 15 jours (5 au 19 décembre). Puis pour chaque condition et période de temps, les résultats des réplicas ont été rassemblés et comparés statistiquement. Les 3 périodes de temps qui ont été définies pour cette comparaison sont (i) une période de référence (R, représentée en vert) de 74 h précédant le démarrage de la contamination (9 décembre 10 h au 12 décembre 12 h), (ii) la période d'exposition n° 1 au pétrole (E1, représentée en orange) de 74 h (12 décembre 13 h au 15 décembre 15 h), (iii) la période d'exposition n° 2 au pétrole (E2, représentée en rouge) de 65 h (15 décembre 16 h au 18 décembre 9 h).

Au cours de la période d'exposition n°1 au pétrole brut seul, le comportement des huitres a été caractérisé par une chute significative de l'amplitude d'ouverture (en comparaison de la période de référence (R),  $p = 0,041$  ; Fig. 5.3.2) et par une augmentation de l'agitation des valves pondérée ( $p = 0,00017$  ; Fig. 5.3.4, VAI). Il n'a en revanche pas été noté de modification de la durée de fermeture ( $p = 0,35$  ; Fig. 5.3.3) ou de l'agitation des valves non pondérée ( $p = 0,76$  ; Fig. 5.3.4, VA). Ces résultats montrent donc que des concentrations moyennes en HAP de  $\approx 120 - 175 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  ont été détectées par les huitres et ont conduit à une modification significative de leur comportement. Ils illustrent la sensibilité du comportement de l'huitre couplé à la Valvométrie HFNI à ces concentrations environnementales faibles. Ces résultats doivent néanmoins être nuancés, d'une part dans le cadre d'un biomonitoring en milieu naturel car ils sont obtenus en conditions contrôlées de laboratoire et d'autre part, car bien que les concentrations mesurées en HAP soient relativement faibles, les huitres ont été exposées à un pétrole brut à des concentrations nominales non négligeables comprises entre 390 et 750  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et non à ces seuls HAP. La réponse comportementale des huitres apparaît cependant cohérente avec celles des corbicules exposés à une concentration nominale de 400  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (§ 5.2; Miserazzi et al., 2020a) et avec la littérature (Chapitre 2, § 2.4 ; Redmond et al., 2018).

En revanche, au cours de la période d'exposition n°2 au pétrole brut seul, aux concentrations plus élevées, le comportement des huitres a évolué différemment. Il a été caractérisé par une augmentation de l'amplitude d'ouverture (en comparaison de la période de référence (R),  $p$

=  $1,5e-09$  ; Fig. 5.3.2), une diminution des durées de fermeture ( $p = 1,1e-10$  ; Fig. 5.3.3) et par une augmentation de l'agitation des valves pondérée ou non ( $p < 2.2e-16$  ; Fig. 5.3.4). À notre connaissance, ce panel de réponse comportementale chez les bivalves, face à ce type de concentration mesurée en HAP ( $\approx 1930 - 4280 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ou de concentration nominale de pétrole brut ( $2800 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), n'est pas référencé dans la littérature.

En comparaison, il n'a pas été mis en évidence d'évolution significative du comportement des huitres dans la condition contrôle, quels que soient les périodes comparées et les paramètres étudiés (Fig. 5.3.5 ; Fig. 5.3.6 ; Fig. 5.3.7).

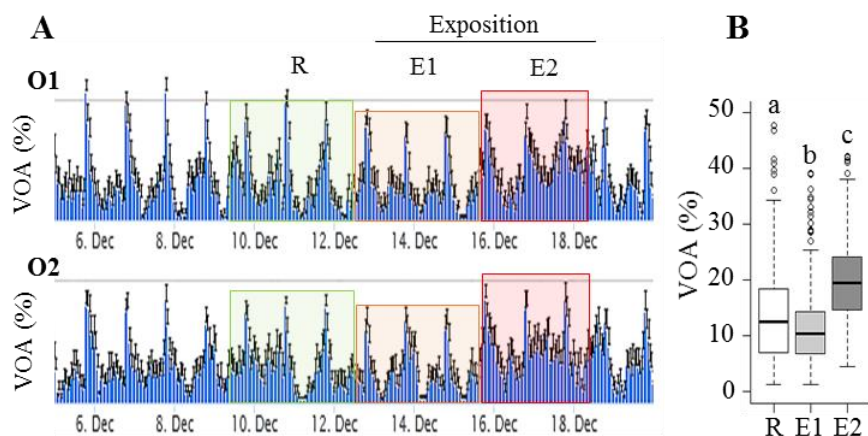


Figure 5.3.2. Evolution de l'amplitude d'ouverture horaire moyenne (VOA, exprimé en %). (A) VOA + 1 erreur standard pour les huitres de la condition O réplique 1 (O1, n = 14-12 huitres) et O réplique 2 (O2, n = 15-13 huitres). En vert, la période de référence (R, 74 h), en orange la période d'exposition au pétrole brut seul n°1 (E1, 74 h), et en rouge, la période d'exposition au pétrole brut seul n°2 (E2, 65 h). (B) Comparaison de VOA en fonction des périodes pour l'ensemble O1 et O2 (R, 148 valeurs ; E1, 148 valeurs ; E2, 130 valeurs). Des lettres différentes représentent des différences significatives ( $p < 0,05$  ; test de Dunn avec correction de Holm).

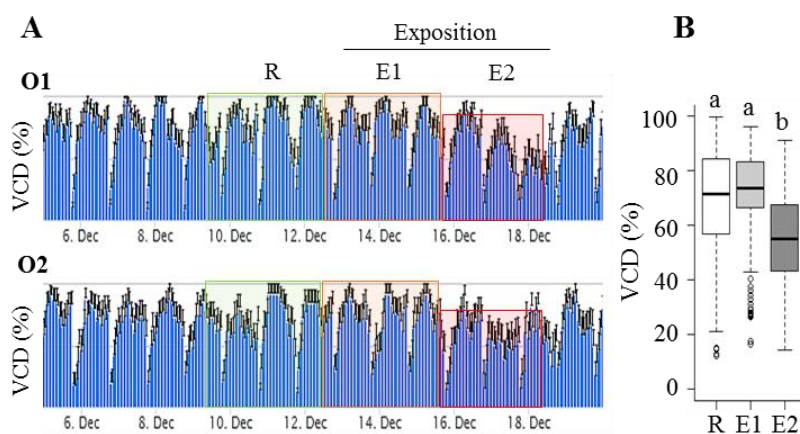


Figure 5.3.3. Evolution de la durée de fermeture horaire moyenne (VCD, exprimé en %). (A) VCD + 1 erreur standard pour les huitres de la condition O réplique 1 (O1, n = 14-12 huitres) et O réplique 2 (O2, n = 15-13 huitres). En vert, la période de référence (R, 74 h), en orange la période d'exposition au pétrole brut seul n°1 (E1, 74 h), et en rouge, la période d'exposition au pétrole brut seul n°2 (E2, 65 h). (B) Comparaison de VCD en fonction des périodes pour l'ensemble O1 et O2 (R, 148 valeurs ; E1, 148 valeurs ; E2, 130 valeurs). Des lettres différentes représentent des différences significatives ( $p < 0,05$  ; test de Dunn avec correction de Holm).

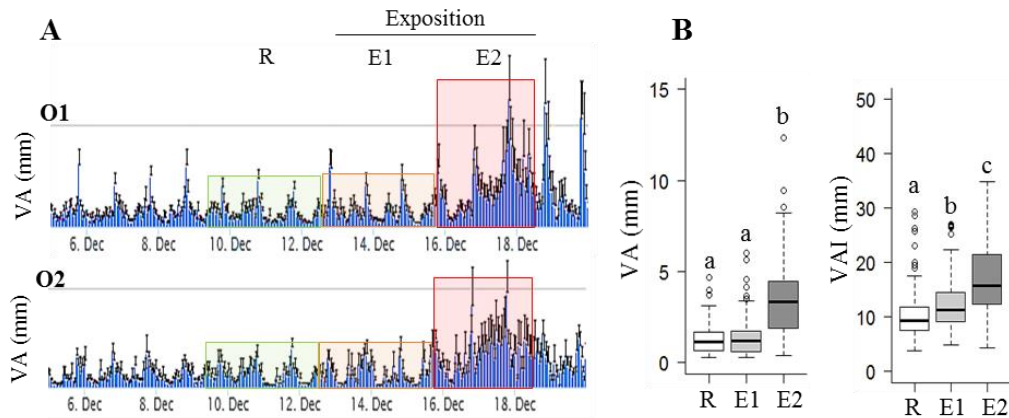


Figure 5.3.4. Evolution de l'agitation des valves horaire moyenne (VA, exprimé en mm). (A) VA + 1 erreur standard pour les huitres de la condition O réplique 1 (O1, n = 14-12 huitres) et O réplique 2 (O2, n = 15-13 huitres). En vert, la période de référence (R, 74 h), en orange la période d'exposition au pétrole brut seul n°1 (E1, 74 h), et en rouge, la période d'exposition au pétrole brut seul n°2 (E2, 65 h). (B) Comparaison de VA et VAI (VA pondéré par VOA) en fonction des périodes pour l'ensemble O1 et O2 (R, 148 valeurs ; E1, 148 valeurs ; E2, 130 valeurs). Des lettres différentes représentent des différences significatives ( $p < 0,05$  ; test de Dunn avec correction de Holm).

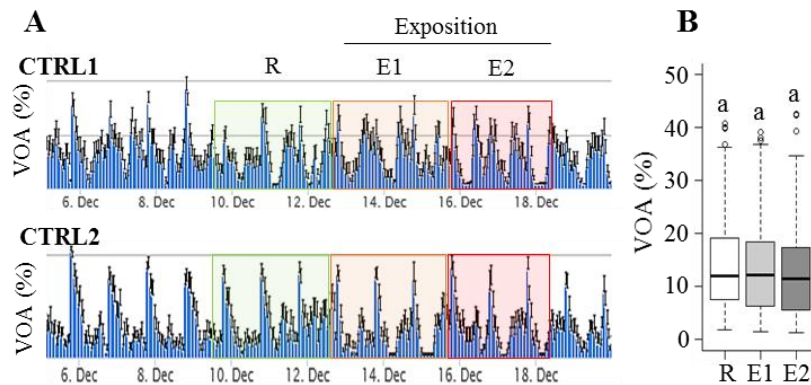


Figure 5.3.5. Evolution de l'amplitude d'ouverture horaire moyenne (VOA, exprimé en %). (A) VOA + 1 erreur standard pour les huitres de la condition contrôle réplique 1 (CTRL1, n = 16-14 huitres) et réplique 2 (CTRL2, n = 15-13 huitres). En vert, la période de référence (R, 74 h), en orange la période d'exposition n°1 (E1, 74 h), et en rouge, la période d'exposition n°2 (E2, 65 h). (B) Comparaison de VOA en fonction des périodes pour l'ensemble CTRL1 et CTRL2 (R, 148 valeurs ; E1, 148 valeurs ; E2, 130 valeurs). Des lettres différentes représentent des différences significatives ( $p < 0,05$  ; test de Dunn avec correction de Holm).

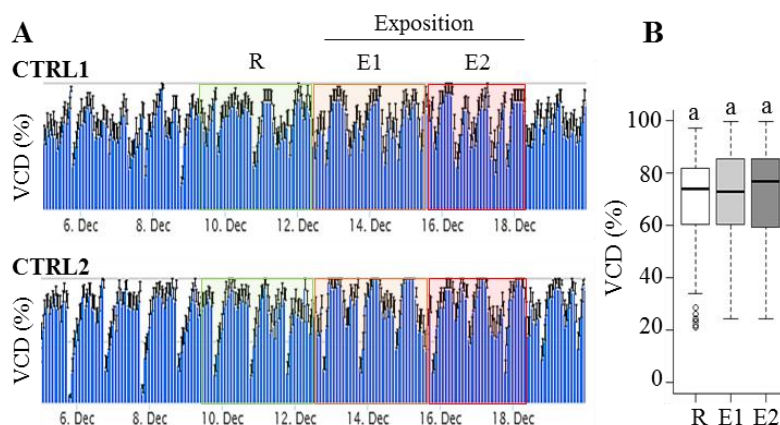


Figure 5.3.6. Evolution de la durée de fermeture horaire moyenne (VCD, exprimé en %). (A) VCD + 1 erreur standard pour les huitres de la condition contrôle réplique 1 (CTRL1,  $n = 16-14$  huitres) et réplique 2 (CTRL2,  $n = 15-13$  huitres). En vert, la période de référence (R, 74 h), en orange la période d'exposition n°1 (E1, 74 h), et en rouge, la période d'exposition n°2 (E2, 65 h). (B) Comparaison de VCD en fonction des périodes pour l'ensemble CTRL1 et CTRL2 (R, 148 valeurs ; E1, 148 valeurs ; E2, 130 valeurs). Des lettres différentes représentent des différences significatives ( $p < 0,05$  ; test de Dunn avec correction de Holm).

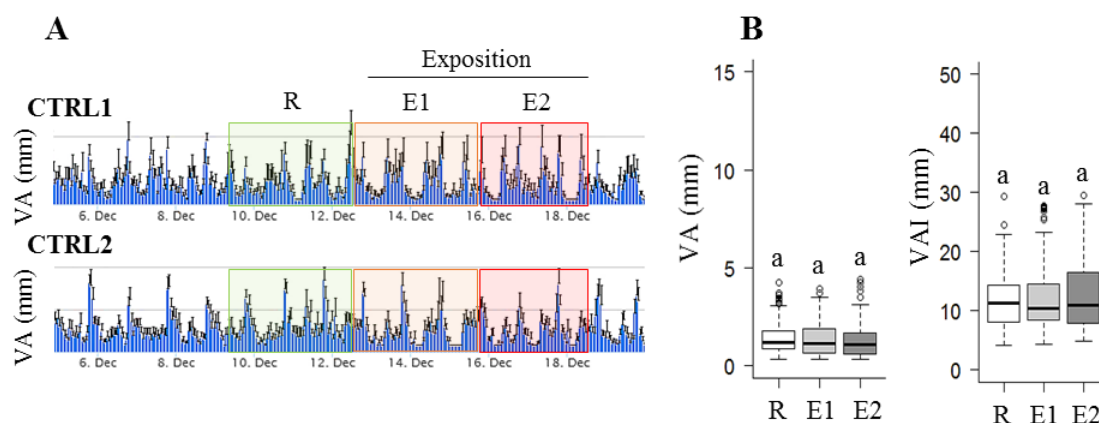


Figure 5.3.7. Evolution de l'agitation des valves horaire moyenne (VA, exprimé en mm). (A) VA + 1 erreur standard pour les huitres de la condition contrôle réplique 1 (CTRL1,  $n = 16-14$  huitres) et réplique 2 (CTRL2,  $n = 15-13$  huitres). En vert, la période de référence (R, 74 h), en orange la période d'exposition n°1 (E1, 74 h), et en rouge, la période d'exposition n°2 (E2, 65 h). (B) Comparaison de VA et VAI (VA pondéré par VOA) en fonction des périodes pour l'ensemble CTRL1 et CTRL2 (R, 148 valeurs ; E1, 148 valeurs ; E2, 130 valeurs). Des lettres différentes représentent des différences significatives ( $p < 0,05$  ; test de Dunn avec correction de Holm).

### 5.3.2.3 Réponses comportementales des huitres en conditions multistress

En ce qui concerne l'étude du comportement des huitres en conditions multistress, les analyses sont présentées de la même façon que les précédentes. Rappelons cependant que durant la période de référence de ces analyses, les huitres sont exposées, soit à la pollution sonore, soit à l'hypoxie.

En présence de pollution sonore, lors de l'exposition additionnelle de pétrole brut aux concentrations de la période d'exposition n°1 (E1), le comportement des huitres n'a pas été modifié. En effet, l'amplitude d'ouverture des huitres exposées au pétrole brut + pollution sonore est identique à l'amplitude d'ouverture des huitres exposées à la pollution sonore uniquement (comparaison E1 et R,  $p = 0,82$  ; Fig. 5.3.8). Mêmes conclusions pour la durée de fermeture ( $p = 1$  ; Fig. 5.3.9), pour l'agitation des valves non pondérée ( $p = 0,35$  ; Fig. 5.3.10, VA) ou pondérée ( $p = 0,36$  ; Fig. 5.3.10, VAI). Au cours de la période d'exposition n°1, la réponse au pétrole brut seul mise en évidence au cours des analyses précédentes (§ 5.3.2.2) n'est donc pas retrouvée en présence de pollution sonore. Les conclusions sont en revanche différentes en ce qui concerne la période d'exposition n°2. En effet, de façon cohérente avec l'exposition des huitres au pétrole seul, on retrouve en présence de pollution sonore, une augmentation significative de l'amplitude d'ouverture des huitres (comparaison E2 et R,  $p = 3,3e-16$  ; Fig. 5.3.8), une diminution des durées de fermeture ( $p = 4,1e-13$  ; Fig. 5.3.9) ainsi qu'une augmentation de l'agitation des valves pondérée ( $p = 1,3e-05$  ; Fig. 5.3.10, VAI) ou non ( $p < 2,2e-16$  ; Fig. 5.3.10, VA).

Globalement, le même panel de réponse se retrouve en présence d'hypoxie. Lors de l'exposition additionnelle de pétrole brut aux concentrations de la période d'exposition n°1 (E1), le comportement des huitres n'est quasiment pas modifié. L'amplitude d'ouverture des huitres exposées au pétrole brut + hypoxie est identique à l'amplitude d'ouverture des huitres exposées à l'hypoxie uniquement (comparaison E1 et R,  $p = 0,58$  ; Fig. 5.3.11). Mêmes conclusions pour la durée de fermeture ( $p = 0,75$  ; Fig. 5.3.12) et pour l'agitation des valves non pondérée ( $p = 0,70$  ; Fig. 5.3.13, VA). Seule l'agitation pondérée des valves augmente de façon significative ( $p = 0,036$  ; Fig. 5.3.13, VAI) tout comme lors de l'exposition des huitres au pétrole brut seul (Fig. 5.3.4, VAI). Au cours de la période d'exposition n°1, la réponse au pétrole brut seul mise en évidence au cours des analyses

précédentes (§ 5.3.2.2) n'est donc quasiment pas retrouvée en présence d'hypoxie. Les conclusions sont à nouveau différentes en ce qui concerne la période d'exposition n°2. En effet, de façon cohérente avec l'exposition des huitres au pétrole seul, on retrouve en présence d'hypoxie, une augmentation significative de l'amplitude d'ouverture (comparaison E2 et R,  $p = 0,00083$  ; Fig. 5.3.11), une diminution des durées de fermeture ( $p = 0,00026$  ; Fig. 5.3.12) ainsi qu'une augmentation de l'agitation des valves pondérée ( $p = 2,2e-05$  ; Fig. 5.3.13, VAI) ou non ( $p = 4,3e-11$  ; Fig. 5.3.13, VA).

Pour conclure, aux plus faibles concentrations de pétrole brut testées dans cette étude (période d'exposition n°1, E1), les caractéristiques de la réponse comportementale des huitres au pétrole brut seul n'ont pas été retrouvées en présence de pollution sonore ou d'hypoxie. Autrement dit, durant la période d'exposition E1, la pollution sonore « lourde » de 92 cargos / jour et l'hypoxie très profonde à  $PO_2 = 2-3$  kPa ont perturbé la réponse comportementale des huitres au pétrole brut. En revanche, lors de la période d'exposition n°2 (E2) à une concentration plus forte de pétrole brut, la réponse des huitres au pétrole est clairement retrouvée de façon significative, que cela soit en présence de la pollution sonore ou de l'hypoxie.

Les données ne sont pas présentées de façon à être exploitées dans ce manuscrit mais en présence de pollution sonore seule, il a été observé une diminution de l'amplitude d'ouverture des valves des huitres et ce, de façon cohérente avec l'effet dépresseur de la pollution sonore mis en évidence dans le Chapitre 4 (Charifi et al., 2018). En présence d'hypoxie, il n'a pas été mis en évidence d'effet sur le comportement des huitres au travers des paramètres comportementaux étudiés.

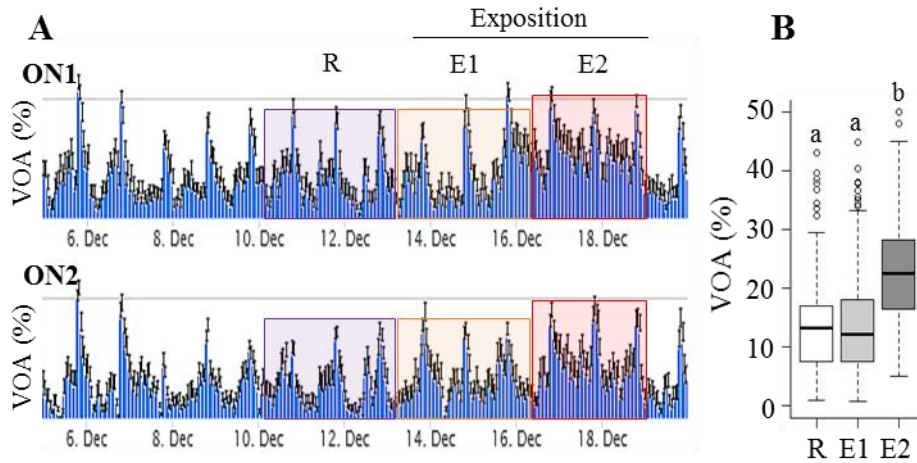


Figure 5.3.8. Evolution de l'amplitude d'ouverture horaire moyenne (VOA, exprimé en %). (A) VOA + 1 erreur standard pour les huitres de la condition pétrole + bruit réplica 1 (ON1, n = 16-14 huitres) et réplica 2 (ON2, n = 15-13 huitres). En vert, la période de référence (R, 74 h), en orange la période d'exposition au pétrole brut n°1 (E1, 74 h), et en rouge, la période d'exposition au pétrole brut n°2 (E2, 65 h). (B) Comparaison de VOA en fonction des périodes pour l'ensemble ON1 et ON2 (R, 148 valeurs ; E1, 148 valeurs ; E2, 130 valeurs). Des lettres différentes représentent des différences significatives ( $p < 0,05$  ; test de Dunn avec correction de Holm).

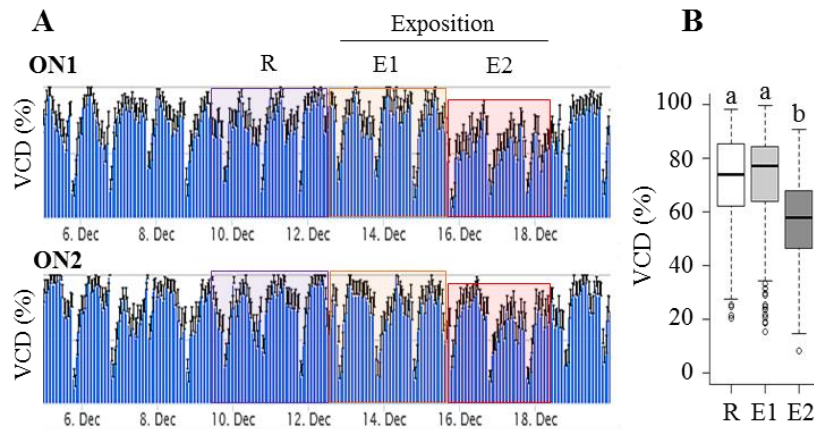


Figure 5.3.9. Evolution de la durée de fermeture horaire moyenne (VCD, exprimé en %). (A) VCD + 1 erreur standard pour les huitres de la condition pétrole + bruit réplica 1 (ON1, n = 16-14 huitres) et réplica 2 (ON2, n = 15-13 huitres). En vert, la période de référence (R, 74 h), en orange la période d'exposition au pétrole brut n°1 (E1, 74 h), et en rouge, la période d'exposition au pétrole brut n°2 (E2, 65 h). (B) Comparaison de VCD en fonction des périodes pour l'ensemble ON1 et ON2 (R, 148 valeurs ; E1, 148 valeurs ; E2, 130 valeurs). Des lettres différentes représentent des différences significatives ( $p < 0,05$  ; test de Dunn avec correction de Holm).



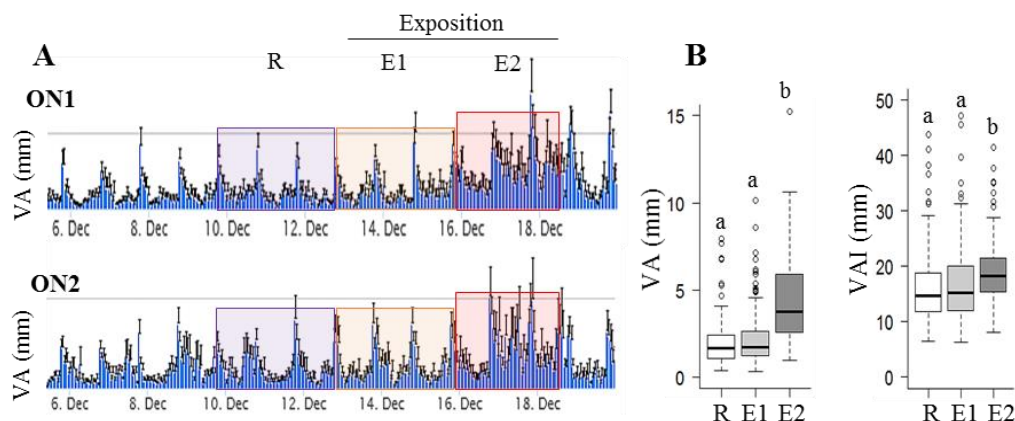


Figure 5.3.10. Evolution de l'agitation des valves horaire moyenne (VA, exprimé en mm). (A) VA + 1 erreur standard pour les huitres de la condition pétrole + bruit réplica 1 (ON1, n = 16-14 huitres) et réplica 2 (ON2, n = 15-13 huitres). En vert, la période de référence (R, 74 h), en orange la période d'exposition au pétrole brut n°1 (E1, 74 h), et en rouge, la période d'exposition au pétrole brut n°2 (E2, 65 h). (B) Comparaison de VA et VAI (VA pondéré par VOA) en fonction des périodes pour l'ensemble ON1 et ON2 (R, 148 valeurs ; E1, 148 valeurs ; E2, 130 valeurs). Des lettres différentes représentent des différences significatives ( $p < 0,05$  ; test de Dunn avec correction de Holm).

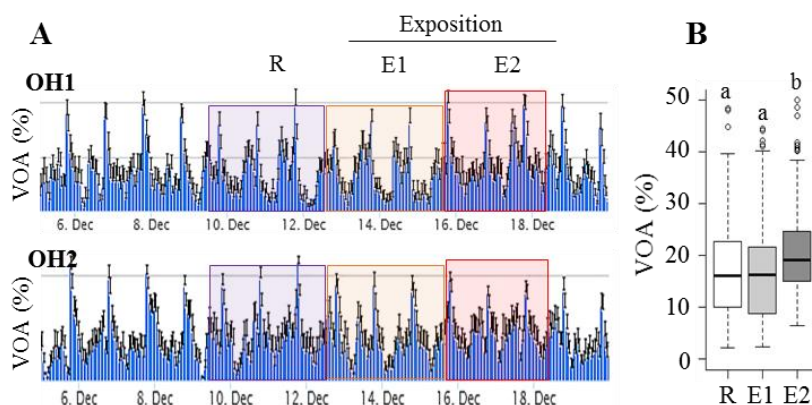


Figure 5.3.11. Evolution de l'amplitude d'ouverture horaire moyenne (VOA, exprimé en %). (A) VOA + 1 erreur standard pour les huitres de la condition pétrole + hypoxie réplica 1 (OH1, n = 16-14 huitres) et réplica 2 (OH2, n = 16-14 huitres). En vert, la période de référence (R, 74 h), en orange la période d'exposition au pétrole brut n°1 (E1, 74 h), et en rouge, la période d'exposition au pétrole brut n°2 (E2, 65 h). (B) Comparaison de VOA en fonction des périodes pour l'ensemble OH1 et OH2 (R, 148 valeurs ; E1, 148 valeurs ; E2, 130 valeurs). Des lettres différentes représentent des différences significatives ( $p < 0,05$  ; test de Dunn avec correction de Holm).

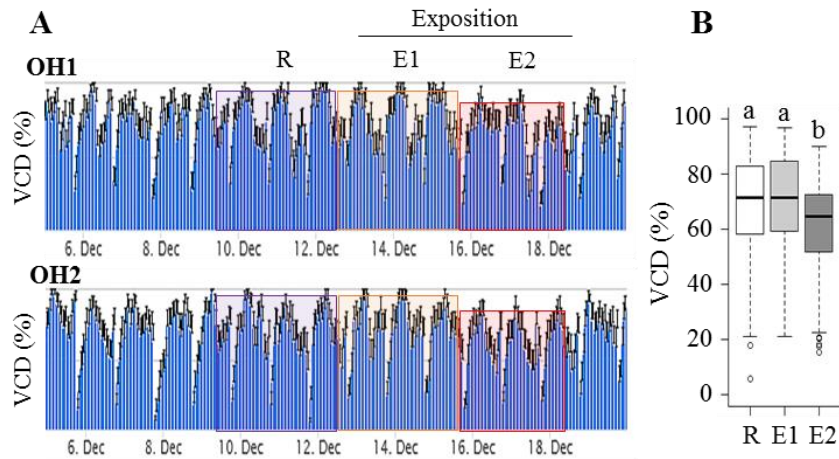


Figure 5.3.12. Evolution de la durée de fermeture horaire moyenne (VCD, exprimé en %). (A) VCD + 1 erreur standard pour les huitres de la condition pétrole + hypoxie réplica 1 (OH1, n = 16-14 huitres) et réplica 2 (OH2, n = 16-14 huitres). En vert, la période de référence (R, 74 h), en orange la période d'exposition au pétrole brut n°1 (E1, 74 h), et en rouge, la période d'exposition au pétrole brut n°2 (E2, 65 h). (B) Comparaison de VCD en fonction des périodes pour l'ensemble OH1 et OH2 (R, 148 valeurs ; E1, 148 valeurs ; E2, 130 valeurs). Des lettres différentes représentent des différences significatives ( $p < 0,05$  ; test de Dunn avec correction de Holm).

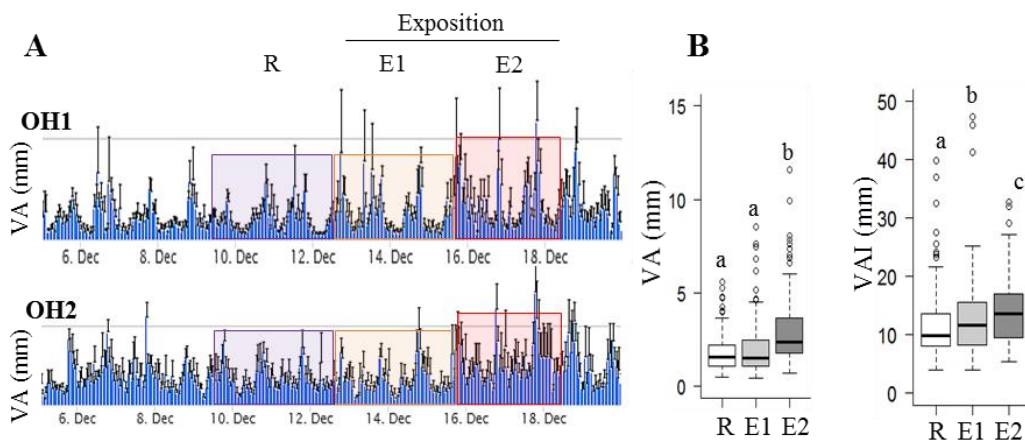


Figure 5.3.13. Evolution de l'agitation des valves horaire moyenne (VA, exprimé en mm). (A) VA + 1 erreur standard pour les huitres de la condition pétrole + hypoxie réplica 1 (OH1, n = 16-14 huitres) et réplica 2 (OH2, n = 16-14 huitres). En vert, la période de référence (R, 74 h), en orange la période d'exposition au pétrole brut n°1 (E1, 74 h), et en rouge, la période d'exposition au pétrole brut n°2 (E2, 65 h). (B) Comparaison de VA et VAI (VA pondéré par VOA) en fonction des périodes pour l'ensemble OH1 et OH2 (R, 148 valeurs ; E1, 148 valeurs ; E2, 130 valeurs). Des lettres différentes représentent des différences significatives ( $p < 0,05$  ; test de Dunn avec correction de Holm).

### 5.3.2.4 Contamination des huitres

La Figure 5.3.14 montre les concentrations en HAP (18 composés parents + 3 composés alkylés) dans le corps mou entier des huitres à l'issue de l'expérimentation c'est-à-dire à l'issue de 8 jours d'exposition des huitres au pétrole brut à différentes concentrations (§ 5.3.2.1 ; Fig. 5.3.1 ; flèches bleues), en condition mono et multistress. Les huitres se sont significativement contaminées en présence de pétrole seul (O), de pétrole + pollution sonore (ON) et de pétrole + hypoxie (OH) par rapport aux huitres (C) non exposées (respectivement,  $p = 0,00053$  ;  $p = 0,00557$  ;  $p = 0,00250$ ). Les valeurs médianes sont de  $0 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (ww) pour les huitres contrôles (C), de  $418 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (ww) pour les huitres exposées au pétrole seul (O), de  $315 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (ww) pour les huitres exposées au pétrole + pollution sonore (ON) et de  $238 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (ww) pour les huitres exposées au pétrole + hypoxie (OH). Si l'on compare ces valeurs à celles de la littérature, les concentrations dosées dans les huitres à la suite de cette expérimentation sont entre 6 et 10 fois plus élevées que les concentrations moyennes mesurées dans le corps mou entier des huitres du bassin d'Arcachon (Auby et al., 2013 ;  $\sum 12 \text{ HAP} \approx 200 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (dw) ; i.e.  $\approx 40 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (ww)), entre 12 et 20 fois plus élevées que les valeurs maximales mesurées dans les moules de différents sites côtiers de mer méditerranée (Galgani et al., 2011 ;  $\sum 16 \text{ HAP} \approx 100 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (dw) ; i.e.  $\approx 20 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (ww)) ou encore entre 5 et 8 fois plus élevées que les valeurs maximales moyennes relevées dans des huitres de la baie de Marennes Oléron (Luna-Acosta et al., 2015 ;  $\sum 31 \text{ HAP} \approx 240 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (dw) ; i.e.  $\approx 48 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (ww)).

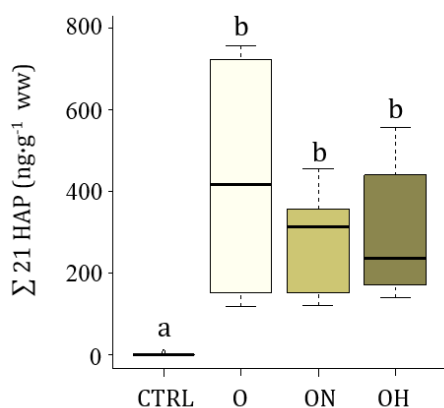


Figure 5.3.14. Somme des concentrations en HAP (18 composés parents + 3 composés alkylés, exprimée en  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , poids frais) dans l'intégralité du corps mou des huitres à la fin de l'expérimentation (P8 le 20 Dec., flèche bleue sur la Fig. 5.3.1) pour les conditions contrôles (CTRL,  $n = 6$  huitres), pétrole seul (O,  $n = 6$  huitres), pétrole + bruit (ON,  $n = 5$  huitres) et pétrole + hypoxie (OH,  $n = 6$  huitres). Des lettres différentes représentent des différences significatives ( $p < 0,05$  ; test de Conover avec correction de Holm).

Dans notre expérimentation, en présence de pétrole (O, ON, OH), la contamination des huitres n'est pas statistiquement différente ( $p = 1$  pour les comparaisons O et ON, O et OH, OH et ON). On peut cependant remarquer la plus large dispersion des données et la médiane plus élevée en présence de pétrole seul (O) qu'en présence de pétrole + pollution sonore (ON) ou de pétrole + hypoxie (OH). Ces observations pourraient suggérer que les conditions physiologiques des organismes étaient différentes au cours des expositions. En conditions hypoxiques, le niveau d'oxygénation était réglé à une pression partielle ( $PO_2$ ) de 2-3 kPa. Cette pression partielle correspond à la pression critique en dessous de laquelle l'activité ventilatoire des organismes aquatiques peut diminuer (Massabuau et Abele, 2011). En dessous de la pression critique, l'oxygénation devient limitante pour les cellules, l'activité des muscles ventilatoires diminue et donc la ventilation ralentit. Dans notre expérimentation, la tendance à la plus faible contamination des huitres exposées au pétrole + hypoxie suggèrerait donc que leur activité ventilatoire devait probablement être limitée par le niveau d'oxygénation appliqué dans l'eau. Cette tendance vers une plus faible contamination se retrouve également chez les huitres exposées au pétrole + pollution sonore par rapport aux huitres exposées au pétrole seul. Cette observation est cohérente avec celles réalisées dans le Chapitre 4 (Charifi et al., 2018 ; Shi et al., 2019). Dans ce chapitre, il avait été montré que la pollution sonore pouvait réprimer l'activité générale des huitres, ce qui avait entre autres conduit à leur plus faible contamination par le cadmium. L'effet de la pollution sonore se retrouverait ici au travers de la tendance, non significative, à la plus faible contamination des huitres par les HAP.

### **5.3.3 Conclusion**

Au cours de cette partie, nous nous sommes attachés à caractériser la réponse comportementale de l'huitre exposée à une concentration variable de pétrole brut dans des conditions contrôlées de laboratoire. Par suite, nous nous sommes attachés à caractériser cette réponse dans un contexte multistress. Enfin, nous avons présenté l'accumulation de HAP dans le corps mou des huitres exposées.

Au cours de la première période d'exposition (74 h), les huitres ont été exposées à une concentration nominale de  $390 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  puis de  $750 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de pétrole brut. Durant cette

période, les concentrations moyennes dosées en HAP étaient comprises entre  $\approx 120$  et  $175 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . Durant la seconde période d'exposition (65 h), les huitres ont été exposées à une concentration nominale de pétrole brut de  $2800 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Les concentrations moyennes en HAP dosés dans l'eau étaient comprises entre  $\approx 1930 - 4280 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  durant cette période. Alors que les concentrations nominales de pétrole brut sont relativement importantes (Kim et al., 2013 ; Li et al., 2010), les concentrations mesurées en HAP sont dans la gamme faible ou moyenne des valeurs considérées comme environnementales (Sousa et al., 2018 ; Incardona et al., 2014). Durant la première période d'exposition, le comportement des huitres était marqué par une chute de l'amplitude d'ouverture et par une augmentation de l'indice d'agitation des valves (agitation des valves pondérée). Ces modifications comportementales apparaissent cohérentes avec celles décrites chez les corbicules exposés à une concentration nominale de  $400 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  durant une période de 240 h en conditions semi-naturelles (§ 5.2 ; Miserazzi et al., 2020a). Durant la seconde période d'exposition, le comportement des huitres est, à l'inverse, caractérisé par une augmentation de l'amplitude d'ouverture, par une diminution des durées de fermeture et par une augmentation de l'agitation des valves, qu'elle soit ou non pondérée. Un continuum de la réponse comportementale pourrait donc être envisagé en fonction des concentrations d'exposition. En conditions multistress, nous avons choisi de travailler avec une pollution sonore relativement importante (avec un protocole identique à celui décrit dans le Chapitre 4 ; Charifi et al., 2018), une hypoxie également importante (2-3 kPa) et nous avons choisi de préexposer les huitres à ces deux facteurs de stress. Le but était ici de renforcer l'effet potentiellement confondant de ces deux perturbateurs sur la réponse des huitres au pétrole. Durant la première période d'exposition au pétrole en conditions multistress, les caractéristiques de la réponse comportementale des huitres observées en présence de pétrole brut seul n'ont pas été retrouvées, que cela soit en présence de pollution sonore ou d'hypoxie. En revanche, lors de la seconde période d'exposition au pétrole brut (aux concentrations testées plus élevées), que cela soit en présence de pollution sonore ou d'hypoxie, la réponse des huitres au pétrole seul a été clairement retrouvée, de façon significative. À ces concentrations, le comportement des huitres, qui ne semble pas indiquer un comportement de protection face à la contamination, pourrait être la conséquence d'une accumulation importante d'hydrocarbures dans leur milieu intérieur et de leurs effets toxiques. À l'issue de cette expérimentation, les dosages de HAP réalisés dans les huitres entières indiquent une contamination significative des huitres exposées, une absence de

différence significative d'accumulation entre conditions d'exposition, et des valeurs médianes qui sont relativement élevées par rapport aux valeurs d'accumulation pouvant être recensées dans le milieu naturel.

## 5.4 Conclusions du chapitre

Dans ce chapitre nous avons étudié la réponse comportementale de deux mollusques bivalves, *C. fluminea*, une palourde d'eau douce, et *M. gigas*, l'huitre du Pacifique. L'expérimentation sur *C. fluminea* a été réalisée sur le site des Rivières Pilotes de TOTAL à Lacq, en milieu semi-naturel. Celle sur *M. gigas* a été réalisée en laboratoire, à la Station Marine d'Arcachon, en conditions contrôlées. En supplément du suivi continu du comportement, nous avons analysé, en collaboration avec le Cedre, la contamination de différents tissus cibles en relation avec le comportement chez *C. fluminea* et du corps mou entier des huitres *M. gigas*.

Lors de l'expérimentation en conditions semi-naturelles avec *C. fluminea*, la concentration de pétrole brut a été maintenue constante (concentration nominale,  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ; concentration mesurée en HCT,  $\approx 170 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Les facteurs de stress additionnels ainsi que leur « force » ont été choisis de façon à se rapprocher de situations pouvant être rencontrées dans le milieu naturel. Le baryum a été utilisé à des concentrations de  $90 - 100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (bruit de fond géochimique,  $\approx 14 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), la pollution sonore a été mimée par le passage de 4 – 7 passages de cargo par jour (pression sonore maximale,  $\approx 150 \text{ dB re } 1 \mu\text{Pa}$ ), la turbidité a été réalisée sous la forme de pulses de 3 heures par jour à  $\approx 260 \text{ NTU}$ . En parallèle, un autre facteur de stress s'est ajouté de façon non contrôlée : la chute de la température de l'eau (de  $12,5$  à  $6,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ). En conditions de laboratoire avec l'huitre, nous avons voulu compléter et étendre les observations faites en extérieur dans les rivières artificielles d'eau douce. Nous avons travaillé en circuits ouverts d'eau de mer à concentration variable de pétrole brut (concentrations nominales,  $390$  à  $2800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ; concentrations mesurées en HAP,  $\approx 120$  à  $4300 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ). En conditions multistress, nous avons cette fois-ci testé l'impact d'une très forte hypoxie ( $\text{PO}_2$  maintenue à  $2-3 \text{ kPa}$  contre  $21 \text{ kPa}$  dans une eau équilibrée à l'air) et d'une forte pollution sonore (identique à celle du Chapitre 4 ; 92 passages de cargo par jour ; pression sonore maximale,  $\approx 150 \text{ dB re } 1 \mu\text{Pa}$ ).

Les principales conclusions de ce chapitre sont les suivantes :

Il n'y a pas de différence fondamentale entre les deux espèces étudiées ici (*C. fluminea* et *M. gigas*) en ce qui concerne la réponse comportementale au pétrole brut. En conditions

semi-naturelles et à une concentration nominale de  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , le comportement des corbicules est caractérisé par l'évolution de 3 paramètres : la diminution de l'amplitude d'ouverture, l'augmentation des durées de fermeture et l'augmentation de l'indice d'agitation des valves. A des concentrations nominales comprises entre  $390$  et  $750 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , le comportement des huitres a été caractérisé par l'évolution de 2 de ces paramètres : la diminution de l'amplitude d'ouverture et l'augmentation de l'indice d'agitation des valves.

Si l'on met ces résultats en parallèle de ceux de Bénégui et al. (2014), on s'aperçoit que la réponse comportementale au pétrole brut analysée avec la Valvométrie HFNI est fiable et reproductible dans le temps (expérimentations réalisées en 2014, 2016-2017, 2018).

Le type de réponse comportementale dépend de la concentration de pétrole brut. Nous l'avons montré ici chez l'huitre (§ 5.3). En effet, lors de l'exposition de l'huitre à des concentrations nominales s'élevant à  $2800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , nous avons observé un comportement caractérisé par une augmentation des durées d'ouverture, par une augmentation de l'amplitude d'ouverture et par une augmentation globale de l'agitation des valves.

Chez *C. fluminea*, en conditions semi-naturelles multistress, la présence de baryum, l'exposition à des pulses de turbidité, à la pollution sonore générée par le passage de 4 à 7 cargos par jour et la chute de la température de l'eau n'ont pas masqué la réponse comportementale au pétrole brut. En ce qui concerne la contamination des corbicules, nous avons montré que les branchies étaient plus contaminées que le pied qui était plus contaminé que les muscles adducteurs. Bien qu'il existe un lien entre comportement et contamination des corbicules exposés et non exposés au pétrole brut, il ne semble pas exister de lien évident entre le comportement et la contamination des corbicules exposés au pétrole brut seul ou en condition multistress (concentration nominale d'exposition,  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ; concentration mesurée,  $\approx 170 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Il apparait également que la lisibilité de la réponse comportementale au pétrole brut en présence d'autres facteurs de stress dépend de la puissance de l'ensemble des facteurs de stress. Chez l'huitre, en présence d'hypoxie profonde ( $\text{PO}_2 = 2\text{-}3 \text{ kPa}$ ) ou de pollution sonore générée par le bruit de 92 cargos par jour, la réponse comportementale au pétrole brut est claire et discernable à  $2800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  mais ne l'est pas pour des concentrations nominales



comprises entre 390 et 750  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . En ce qui concerne la contamination, l'hypoxie et la pollution sonore pourraient tendre à diminuer la contamination du milieu intérieur des huîtres en présence de pétrole brut.

Afin de mieux comprendre les modifications du milieu intérieur induites par le pétrole brut, sous-jacentes aux modifications comportementales, des analyses du protéome au sein de différents tissus d'intérêt ont été réalisées et sont présentées dans le chapitre suivant (Chapitre 6).

# CHAPITRE 6

PERTURBATIONS SOUS-  
JACENTES AU COMPORTEMENT  
EN PRESENCE DE PETROLE  
BRUT SEUL



## 6.1 Introduction

En parallèle de l'analyse du comportement présentée dans le chapitre précédent, le second objectif de ces travaux de thèse était d'aborder les perturbations du milieu intérieur sous-jacentes aux modifications comportementales. *In fine*, nous cherchons à avoir une vision à distance, par la simple lecture du comportement, des types de perturbations physiologiques et cellulaires que subissent les mollusques bivalves face à une contamination par le pétrole.

Précédemment, nous avons vu que la réponse comportementale des corbicules exposés au pétrole brut était caractérisée par l'évolution de 3 grands paramètres : la diminution de l'amplitude d'ouverture (VOA), l'augmentation des durées de fermeture (VCD) et l'augmentation de l'agitation des valves durant les périodes d'ouverture (VAI). Pour la même gamme de concentrations de pétrole brut dans l'eau, le changement de comportement de l'huitre est semblable à celui des corbicules. En parallèle, nous avons vu que la contamination par les HAP était significative dans les branchies des corbicules exposés au pétrole brut et qu'elle ne l'était pas dans le pool muscles + ganglions nerveux. Néanmoins, cela ne nous permet pas de conclure à une absence totale de contamination dans les ganglions nerveux car (i) leur masse est très nettement inférieure à celle des muscles et (ii) les tissus nerveux sont des tissus riches en lipides, notamment par rapport aux muscles. Ils pourraient donc être significativement contaminés sans que cela apparaisse dans le dosage.

Pour avoir une vision d'ensemble des mécanismes modifiés dans le milieu intérieur des corbicules à l'issue des premiers jours d'exposition au pétrole brut, nous avons choisi la protéomique différentielle (i.e. entre corbicules exposés vs non exposés), ciblée sur des tissus d'intérêt. Ces analyses ont été faites sur des corbicules exposés aux rivières artificielles à Lacq en même temps que celles qui ont servi à l'analyse comportementale présentée dans le Chapitre 5 (§ 5.2). Ces résultats sont présentés dans le § 6.2 qui suit. Ils font l'objet d'une publication (Miserazzi et al. 2020b).

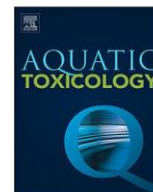
Quand on s'intéresse au comportement, le cerveau est l'organe clé, le comprendre est la base des neurosciences comportementales. C'est l'organe dont le fonctionnement a des répercussions directes sur nos capacités cognitives et comportementales. Prélever uniquement du tissu nerveux (le ganglion viscéral par exemple) chez le corbicule pour faire

de la protéomique était une gageure irréaliste. Les tissus sont très petits, la dissection aurait été trop longue et les protéines potentiellement impactées avant la fin du prélèvement. Chez l'huitre, le challenge était réalisable. De plus, nous avons vu que l'huitre est un cas unique comparé à l'ensemble des autres mollusques bivalves. Le ganglion viscéral a été assimilé à un « cerveau » qui regrouperait diverses fonctions puisqu'il est le résultat de la fusion de plusieurs ganglions (Chapitre 3 ; § 3.4.1). Nous avons donc profité de cette particularité anatomique pour prélever, chez des huitres dont le comportement et la contamination ont été étudiés dans le Chapitre 5 (§ 5.3), les ganglions viscéraux des animaux contrôles et des animaux exposés au pétrole brut seul. Le but était de réaliser une analyse protéomique totalement originale. Les résultats sont présentés dans le § 6.3 de ce chapitre. Ils feront l'objet d'un article par la suite.

## **6.2 Article: Proteome changes in muscles, ganglia, and gills in *Corbicula fluminea* clams exposed to crude oil: relationship with behavioural disturbances.**

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105482>

Les analyses présentées ici ont été réalisées dans le pool muscles + ganglions et dans les branchies de corbicules exposés ou non au pétrole brut seul lors de l'expérience rapportée dans le Chapitre 5 (§ 5.2). Ces tissus ont été sélectionnés pour leurs rôles d'intérêts en relation avec le comportement et face à la contamination. L'analyse protéomique a été choisie car elle nous permet d'accéder aux perturbations du milieu intérieur de façon globale, sans *a priori* préalable (comme lors de l'analyse de gènes cibles par exemple). Les objectifs de ces analyses de protéomique réalisées sont doubles. Premièrement, ces analyses ont pour but de nous permettre d'aboutir à une caractérisation plus complète des perturbations induites chez des corbicules exposés au pétrole brut, en plus des analyses comportementales et de contamination. Deuxièmement, ces analyses ont pour but de nous permettre de proposer un ou plusieurs scénario(s) pouvant expliquer les changements de comportement des corbicules exposés au pétrole brut.



## Proteome changes in muscles, ganglia, and gills in *Corbicula fluminea* clams exposed to crude oil: Relationship with behavioural disturbances



A. Miserazzi<sup>a,b</sup>, M. Perrigault<sup>a,b</sup>, M. Sow<sup>a,b</sup>, C. Gelber<sup>c</sup>, P. Ciret<sup>a,b</sup>, A.M. Lomenech<sup>d</sup>, J.M. Dalens<sup>c</sup>, C. Weber<sup>c</sup>, S. Le Floch<sup>e</sup>, C. Lacroix<sup>e</sup>, P. Blanc<sup>f</sup>, J.C. Massabuau<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> University of Bordeaux, EPOC, UMR 5805, Arcachon, France

<sup>b</sup> CNRS, EPOC, UMR 5805, Talence, France

<sup>c</sup> Pôles d'études et de Recherche de Lacq, TOTAL, Lacq, France

<sup>d</sup> Center of Functional Genomics, Bordeaux University, Bordeaux, France

<sup>e</sup> CEDRE, Brest, France

<sup>f</sup> CSTJF, TOTAL SA, Pau, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Biomonitoring  
Oil spill  
Proteomics  
Behavior  
PAH  
Asiatic clam

### ABSTRACT

The use of online remote control for 24/7 behavioural monitoring can play a key role in estimating the environmental status of aquatic ecosystems. Recording the valve activity of bivalve molluscs is a relevant approach in this context. However, a clear understanding of the underlying disturbances associated with behaviour is a key step. In this work, we studied freshwater Asian clams after exposure to crude oil (measured concentration,  $167 \pm 28 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for three days in a semi-natural environment using outdoor artificial streams. Three complementary approaches to assess and explore disturbances were used: behaviour by high frequency non-invasive (HFNI) valvometry, tissue contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), and proteomic analysis. Two tissues were targeted: the pool adductor muscles – retractor pedal muscle – cerebral and visceral ganglia, which is the effector of any valve movement and the gills, which are on the frontline during contamination. The behavioural response was marked by an increase in valve closure-duration, a decrease in valve opening-amplitude and an increase in valve agitation index during opening periods. There was no significant PAH accumulation in the muscle plus nervous ganglia pool, contrary to the situation in the gills, although the latter remained in the low range of data available in literature. Major proteomic changes included (i) a slowdown in metabolic and/or cellular processes in muscles plus ganglia pool associated with minor toxicological effect and (ii) an increase of metabolic and/or cellular processes in gills associated with a greater toxicological effect. The nature of the proteomic changes is discussed in terms of unequal PAH distribution and allows to propose a set of explanatory mechanisms to associate behaviour to underlying physiological changes following oil exposure. First, the first tissues facing contaminated water are the inhalant siphon, the mantle edge and the gills. The routine nervous activity in the visceral ganglia should be modified by nervous information originating from these tissues. Second, the nervous activity in the visceral ganglia could be modified by its own specific contamination. Third, a decrease in nervous activity of the cerebral ganglia close to the mouth, including some kind of narcosis, could contribute to a decrease in visceral ganglia activity via a decrease or blockage of the downward neuromodulation by the cerebro-visceral connective. This whole set of events can explain the decrease of metabolic activity in the adductor muscles, contribute to initiate the catch mechanism and then deeply modify the valve behaviour.

### 1. Introduction

Biomonitoring is key in estimating the environmental status of wildlife and their habitats (Goldberg et al., 1978). This is especially true in aquatic ecosystems. Within an environment subject to natural

variations and/or deeply disturbed by human activity, recording the behaviour of organisms is a first response tool that requires consolidation to a mature stage. Disrupted behaviour can be used to establish a link between physiological and ecological alterations (Amiard-Triquet, 2009). Today, behavioural ecotoxicology appears reliable in

\* Corresponding author.

E-mail address: [jean-charles.massabuau@u-bordeaux.fr](mailto:jean-charles.massabuau@u-bordeaux.fr) (J.C. Massabuau).

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105482>

Received 20 January 2020; Received in revised form 23 March 2020; Accepted 25 March 2020

Available online 24 April 2020

0166-445X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

hazard identification, release assessment, exposure assessment, consequence assessment and risk estimation (Hartmann et al., 2016; Pyle and Ford, 2017).

The analysis of valve activity of clams is of particular interest because it allows wireless, 24/7 insight into multiple aspects of the life history of groups of animals over long distances, for 1–3 years (Andrade et al., 2016; Danovaro et al., 2016). Clams are ecologically relevant because most of them are strictly sedentary, sessile, abundant and available year-round. They are filter feeders, which means there is no need to feed them, and using lightweight electrodes and soft cables, one can record artefact-free behaviour readings. Understanding the physiological changes associated with clam-based behavioural monitoring systems is a key step to improving their use for biomonitoring surveys. Hence, proteomic analysis was used in the current study. Protein identification and quantification of individuals subjected to different situations, completed by functional annotations and pathway analysis of proteins, are powerful tools providing access to a global or detailed view of altered biological processes (Campos et al., 2012; Lemos et al., 2010; Van Aggelen et al., 2010). This study was performed on the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* in a semi-natural environment within outdoor artificial streams during the first 3 d of crude oil exposure (Miserazzi et al., 2020). Relatively few studies on the effects of crude oil have been carried out in freshwater environments (Bhattacharyya et al., 2003; Green and Trett, 1989; Monteiro et al., 2019). Today, such studies are still in the minority although multiple anthropogenic causes are responsible for oil pollution in freshwaters, including: oil spills, pipeline failure, urban runoff, waste oils or crude oil extraction, etc. (Green and Trett, 1989). Notably, the solubility of crude oil hydrocarbons is generally greater in freshwater than seawater (Eganhouse and Calder, 1976; Green and Trett, 1989; Rossi and Thomas, 1981) and contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) increases when salinity decreases (Ramachandran et al., 2006; Shukla et al., 2007).

In this study, we first examined key parameters describing the behavioural responses of clams exposed to crude oil by comparison to a reference situation (natural variations only). Thereafter, we focused on the impact of oil in their internal medium by examining tissue that are centrepieces to explain bivalve behaviour, including: (i) the pool adductor muscles-pedal retractor muscles-visceral ganglia-cerebral ganglia and (ii) the gills. We first investigated their respective PAH contamination status and thereafter, explored associated disturbances of major underlying biological-processes by proteomic analysis. Finally, based on this set of indicators, behaviour, PAH contamination and proteomic analysis, we propose a couple of explanatory mechanisms linking behaviour and disturbance of the internal medium in crude oil exposed bivalve molluscs.

This report is the sister report of a recent work on distinguishable behavioural responses to crude oil in Asian clams *Corbicula fluminea* under semi-natural multiple stress conditions (Miserazzi et al., 2020). In brief, to mimic field conditions and for the purposes of the present experiment, clams were exposed in two outdoor artificial streams that were subject to natural variations and were continuously fed by freshwater from the Gave de Pau river (S.W. France). After a 26-day period, the clams ( $n = 16$  per condition) were separately exposed for an additional period of 10 days to crude oil or natural changes alone. In each stream, a longitudinal survey was performed that involved repeated observations of the same behavioural parameters on the same individuals. The results presented here were obtained by sampling *C. fluminea* exposed for 3 days to crude oil alone or natural changes alone, once the behavioural response curve had flattened. In the presence of crude oil, the behaviour of clams was systematically characterised by an increase in valve-closure duration, a decrease in valve-opening amplitude and an increase in valve agitation index. We present here insights into the nature of the underlying associated proteomic changes.

## 2. Materials & methods

### 2.1. Clam sampling and maintenance

Asian clams *C. fluminea* (height, 24–28 mm) were collected in the northern part of the Parentis - Biscarrosse lake, France. Clams were first maintained in 600 l tanks in an open circuit of freshwater for 10 d at the laboratory (Marine Biological Station, Arcachon, France). During this maintenance period, they were equipped with electromagnets to study behaviour by HFNI valvometry (Andrade et al., 2016). Thereafter, all clams (for behavioural, proteomic and PAH tissue contamination analyses) were introduced in artificial stream facilities of TOTAL (Lacq, southwest France; Bassères and Tramier, 2001).

### 2.2. Artificial stream facility

The artificial stream facility is an outdoor experimental site exposed to natural variations and supplied with freshwater from the Gave de Pau River. The water is derived upstream of a dam, flows by gravity in a flow control system, passes through a living organism “nursery” and is identically distributed in 16 experimental streams (length, 40 m; width, 0.5 m; depth, 0.5 m; water depth, 0.25 m) arranged in parallel (Cailleaud et al., 2019; Miserazzi et al., 2020). At the beginning of streams, a piston pump (Prominent) coupled to a high-pressure pump and a shearing valve (Netzsch; Nemo) allows to continuously inject and disperse crude oil in water as micro-droplets. For the requirements of the experiment, in each artificial stream used, quartz and silica sand zones (length, 1 m; depth, 0.1 m) were created to allow the natural burrowing behaviour of clams. The water velocity at clam’s level was  $6 \text{ cm s}^{-1}$  and the average residence time of water was  $\approx 22$  min in a stream.

### 2.3. Experimental protocol

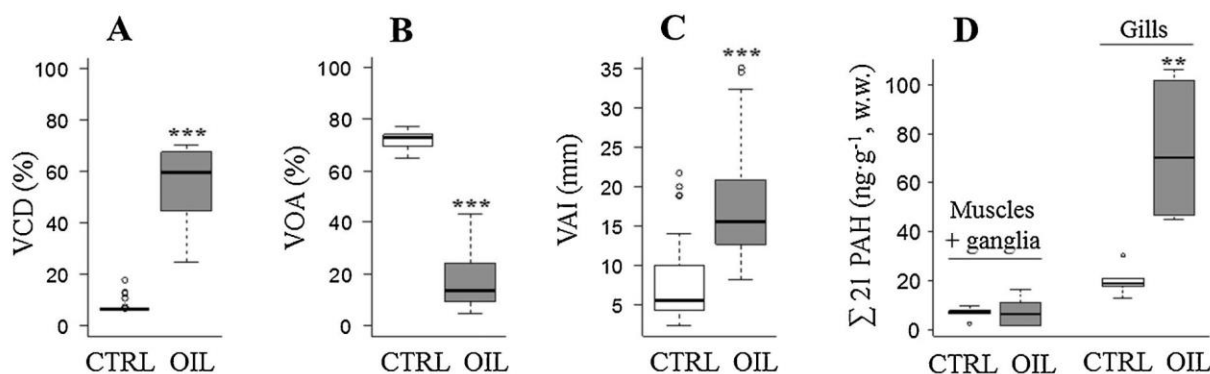
The experiment was carried out from October to December 2016. The experiment was divided into three periods with  $t_0$  being the beginning of the exposure period. Period 1 was a 16 d acclimation period (26th October –10th November) plus a 10 d reference period (11th November – 20th November;  $t_{10}$ – $t_{11}$ ). Period 2 (21st November–1st December;  $t_0$ – $t_{10}$ ) was the exposure period. The exposure period started on  $t_0$  at 03:15 PM (GMT + 1; 21th November). It ended on  $t_{10}$  at 03:15 PM (GMT + 1; 1st December). Period 3 (2nd–11th December;  $t_{11}$ – $t_{20}$ ) was a 10 d post-exposure period. During the experimental period, water temperature varied from 6.6 to 12.5 °C,  $\text{O}_2$  content from 8 to 13 mg  $\text{L}^{-1}$ , pH from 6.5 to 9.5 and conductivity  $\approx 200$ – $300 \mu\text{S cm}^{-1}$ . For the requirements of the experiment, only two artificial streams were used. In one stream, clams were exposed to natural variations only. This is the control (CTRL) condition. In the other stream, clams were exposed to crude oil. This is the crude oil (OIL) condition. We have used non-replicated stream conditions due to logistical problems. For OIL condition, crude oil was continuously injected into the stream ( $6.5 \text{ mL h}^{-1}$ ) to obtain a nominal concentration of  $400 \mu\text{g L}^{-1}$ . In each stream, the behaviour of clams was continuously recorded ( $n = 16$  clams per stream, see section 2.6 for details). These clams were in a first sand zone located at 19–20 m from the crude oil injection. Clams used for tissue sampling were in a second sand zone, located at 29–30 m from the crude oil injection ( $n = 5$  clams per stream for proteomic analysis, see section 2.7 for details;  $n = 5$  clams per stream for contamination analysis, see section 2.8 for details). The spacing between the two zones made it possible to sample in the second zone without disturbing clams in the first zone (Miserazzi et al., 2020).

### 2.4. Crude oil exposure

#### 2.4.1. Crude oil characteristics

Crude oil was a light oil from the North Sea. Its density was 0.77 (at





**Fig. 1.** Behavioural analysis and tissue contamination. (A) Mean hourly valve closure-duration VCD (%;  $n = 64$  for 64 h), (B) mean hourly valve opening-amplitude VOA (%;  $n = 64$  for 64 h), (C) mean hourly valve agitation index VAI (mm;  $n = 64$  for 64 h) of 16 clams by condition, (D) sum of individual concentrations of 21 PAH analysed in muscles plus ganglia pool and gills after 10 d of exposure ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , wet weight;  $n = 5$  clams per condition. Redrawn from Fig. 7 in Miserazzi et al., 2020). Data are given as a boxplot. The top line, middle line and lower line of the box indicate upper quartile, median and lower quartile respectively. The ends of the whiskers indicate the lowest and highest values. The dots are outliers. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; Wilcoxon-Mann-Whitney. CTRL, clams under control condition; OIL, clams exposed to crude oil.

15 °C) and dynamic viscosity was 1.016 mPa·s (at 15 °C). Saturates, aromatics, resins and asphaltenes (SARA) analysis indicated that the residue fraction (representing 28.2% of crude oil, compared to 71.8% for the distillate fraction) contained 84% saturated hydrocarbons, 15.5% aromatic hydrocarbons and 0.5% polar compounds.

#### 2.4.2. Analysis of crude oil contamination

Crude oil injection rates were checked at  $t_1$ ,  $t_3$ ,  $t_4$ ,  $t_7$ ,  $t_8$  and  $t_9$ . The measured average of crude oil injection rate was  $6.6 \pm 0.43 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$  (mean  $\pm$  1 SE). Water was sampled at  $t_1$ ,  $t_3$  and  $t_{10}$ , 35 m downstream of the crude oil injection in the centre of the stream and in the centre of water column in 1 l glass bottles (see Fig. 1 in Miserazzi et al. (2020) for a detailed diagram with location of the sampling point). Water samples were stabilised with methanol and nitric acid. Total petroleum hydrocarbons (TPH) were extracted with 40 ml of hexane and concentrated under nitrogen flux for analysis by gas chromatography with flame-ionization detection (GC-FID), using an Agilent 7890 B GC system (equipped with a 15 m Agilent CP7491 column) and integration of total peak area between C10 and C40. Quality assurance and quality control (QA/QC) were ensured by the calibration curve method (Shrivastava and Gupta, 2011), the analysis of analytical blanks and the analysis of non-contaminated field samples. The mean measured concentration was  $167 \pm 28 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### 2.5. Behaviour analysis

#### 2.5.1. HFNI valvometry

In each stream, the behaviour of 16 clams was continuously assessed by High Frequency Non-Invasive (HFNI) valvometry (Andrade et al., 2016; Tran et al., 2003 for details). Briefly, a pair of lightweight electromagnets ( $< 1 \text{ g}$ ) were glued, face-to-face, on each valve. The voltage variation produced by the electromagnetic current generated between the two electromagnets was recorded every 1.6 s for each bivalve. Daily, data were automatically transmitted to a processing unit (Dell 8 core processor) based in the Marine Biological Station of Arcachon. Data were automatically handled and processed before daily publication on professional pages of the MolluSCAN eye website (<https://molluscan-eye.epoc.u-bordeaux.fr/>).

#### 2.5.2. Behavioural parameters

Hourly valve closure-duration (VCD) and hourly valve opening-amplitude (VOA). For each hour and each bivalve, the VCD (below 5% of valve opening amplitude) and the VOA were reported in percentage. For example, if the bivalve was opened for 1 h, the percentage of VCD was 0% and if the bivalve was closed for 1 h, the percentage was 100%.

The hourly VOA values 100% and 0% were reported from the maximum and minimum values of valve opening, constantly slipping for each bivalve over the previous 6 d. Thereafter, these percentages were determined for the group, averaging 16 bivalve values each hour.

Valve agitation index (VAI). An index of valve agitation weighted was calculated by dividing the average hourly distance travelled (mm) by electromagnets (i.e. by the valves) by the percentage of hourly VOA (%) for the group of 16 bivalves (Miserazzi et al., 2020).

#### 2.5.3. Behavioural data treatment

Taking into account (i), the beginning of clam exposure to crude oil (21th November;  $t_0$ ; 03:15 PM; GMT + 1), (ii) the time for 50% of clams to react (465 min or 7 h and 45 min; Miserazzi et al., 2020) and (iii), the sampling time of clams exposed to crude oil for proteomic analyses (24th November;  $t_3$ ; 03:00 PM GMT + 1), the bivalve behaviour was analysed from 21th November at 11:00 PM (GMT + 1;  $t_0$ ) to 24th November at 03:00 PM (GMT + 1;  $t_3$ ). It represents a 64 h exposure period (i.e. 2 days and 16 h) under oil-exposed conditions. Behavioural data were processed with R software (R Core Team, 2016). After verification of normality and homoscedasticity of error terms, comparisons between the two independent variables were investigated using the non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney test. Statistical differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

### 2.6. Proteomic analysis

#### 2.6.1. Sampling and dissections of clams

Five clams exposed to crude oil (OIL) and five clams exposed to natural variations only (CTRL) were dissected immediately after collection from artificial streams. Clams in OIL condition were dissected at 03:00 PM (GMT + 1) on  $t_3$  (24th November). Clams in CTRL condition were dissected on the same day at 01:00 PM (GMT + 1). Muscles plus ganglia pool ( $n = 5$ ) and gills ( $n = 5$ ) were sampled and stored at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  for 1 d and then at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  until proteomic analysis was performed.

#### 2.6.2. Sample preparation and protein digestion

Total protein extraction was performed by classical TCA-acetone method. Protein samples were solubilised in Laemmli buffer and 10  $\mu\text{g}$  per sample was deposited onto an SDS-PAGE gel for concentration and cleaning purposes. Separation was stopped once proteins entered the resolving gel. After colloidal blue staining, bands were cut out from the SDS-PAGE gel and subsequently cut in  $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$  gel pieces. Gel pieces were destained in 25 mM ammonium bicarbonate 50% ACN, rinsed twice in ultrapure water and shrunk in ACN for 10 min. After ACN removal, gel pieces were dried at room temperature, covered with

trypsin solution (10 ng·μl<sup>-1</sup> in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), rehydrated at 4 °C for 10 min, and finally incubated overnight at 37 °C. Spots were then incubated for 15 min in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> at room temperature with rotary shaking. The supernatant was collected, and an H<sub>2</sub>O/ACN/HCOOH (47.5:47.5:5) extraction solution was added onto gel slices for 15 min. The extraction step was repeated twice. Supernatants were pooled and dried in a vacuum centrifuge. Digests were finally solubilised in 0.1% HCOOH.

### 2.6.3. nLC-MS/MS analysis

Peptide mixture was analysed on an Ultimate 3000 nanoLC system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) coupled to a Electrospray Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Ten microliters of peptide digests were loaded onto a 300-μm-inner diameter × 5 mm C<sub>18</sub> PepMap™ trap column (LC Packings) at a flow rate of 10 μL min<sup>-1</sup>. Peptides were eluted from the trap column onto analytical 75-mm id × 50-cm C18 Pep-Map column (LC Packings) with a 4–40% linear gradient of solvent B in 108 min (solvent A was 0.1% formic acid and solvent B was 0.1% formic acid in 80% ACN). The separation flow rate was set at 300 nL·min<sup>-1</sup>. The mass spectrometer operated in positive ion mode at a 2 kV needle voltage. Data were acquired using Xcalibur 4.1 software in a data-dependent mode. MS scans (*m/z* 375–1500) were recorded at a resolution of *R* = 120 000 (@ *m/z* 200) and an automatic gain control (AGC) target of 4 × 10<sup>5</sup> ions collected within 50 ms. Dynamic exclusion was set to 60 s and top speed fragmentation in higher-energy collision dissociation cell (HCD) mode was performed over a 3 s cycle. MS/MS scans with a target value of 3 × 10<sup>3</sup> ions were collected in orbitrap (with a resolution of *R* = 30 000 (@ *m/z* 200)) with a maximum fill time of 54 ms. Additionally, only + 2 to + 7 charged ions were selected for fragmentation. Other settings were as follows: no sheath nor auxiliary gas flow, heated capillary temperature, 275 °C; normalised HCD collision energy of 30% and an isolation width of 1.6 *m/z*. Monoisotopic precursor selection (MIPS) was set to Peptide and an intensity threshold was set to 2.5 × 10<sup>4</sup>.

### 2.6.4. Database search and results processing

Data were searched by SEQUEST through Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific Inc.) against a laboratory made protein database (69,376 entries). Spectra from peptides higher than 5000 Da or lower than 350 Da were rejected. The search parameters were as follows: mass accuracy of the monoisotopic peptide precursor and peptide fragments set to 10 ppm and 0.6 Da respectively. Only b- and y-ions were considered for mass calculation. Oxidation of methionines (+ 16 Da) and protein N-terminal Acetylation (+ 42 Da) were considered as variable modifications and carbamidomethylation of cysteines (+ 57 Da) as fixed modification. Two missed trypsin cleavages were allowed. Peptide validation was performed using the Percolator algorithm (Käll et al., 2007) and only “high confidence” peptides were retained, corresponding to a 1% False Positive Rate at the peptide level.

### 2.6.5. Label-free quantitative data analysis

Raw LC-MS/MS data from muscles plus ganglia pool and gills were imported in Progenesis QI for Proteomics 2.0 (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle, U.K) in two separate datasets. Data processing includes the following steps: (i) feature detection, (ii) feature alignment across 10 samples, (iii) volume integration for 2–6 charge-state ions, (iv) normalisation on feature ratio median, (v) import of sequence information, and (vi) calculation of protein abundance (sum of the volume of corresponding peptides). Then, data were processed with Perseus (version 1.6.2.3; Tyanova et al., 2016). Data analysis was partially based on the instructions published by Perseus developers (Tyanova and Cox, 2018). Normalised intensities were uploaded in the software, filtered to retain only quantified proteins in at least four out of five samples in at least one group (OIL or CTRL). Thereafter, the remaining missing values were replaced from normal distribution by maintaining the default

settings. An additional filtration was performed to remove proteins labelled as “contaminant”. A log<sub>2</sub> transformation was subsequently performed for each sample. Data reliability was assessed by histogram visualisation and multi-scatter plot with Pearson correlation for each sample. For each protein, statistical analysis was performed between OIL (*n* = 5) and CTRL (*n* = 5) samples with a student *t*-test at FDR (False Discovery Rate; *q*-value) < 0.2 for muscles plus ganglia pool or < 0.25 for gills (Benjamini and Hochberg, 1995). For clustering only, protein abundances were normalised with Z-score. To calculate the protein abundance ratio between both conditions, normalised log<sub>2</sub> intensities (before Z-scoring) was averaged for OIL (*n* = 5) and CTRL samples (*n* = 5). Fold change (FC) was obtained by the 2<sup>[log<sub>2</sub> (OIL mean) - log<sub>2</sub> (CTRL mean)]</sup> operation. To determine which pathways were involved by significant proteins, data were processed with Cytoscape software (version 3.7.1; Shannon et al., 2003) and ClueGO (version 2.5.4; Bindea et al., 2009) plus CluePedia (version 1.5.4; Bindea et al., 2013) plug-ins. Analyses were carried out independently for both tissues and protein clusters (i.e. proteins with highest or lowest abundance). Gene identifiers in the oyster *Crassostrea gigas*, corresponding to selected proteins, were uploaded in the software instead of the database on *Corbicula fluminea* (Chen et al., 2013). We used the *C. gigas* database because it is considered as the most complete reference transcriptome today in aquatic invertebrates. It was realized using embryo-larval development stages and adult organs as well and a large number of environmental stressors (Rivière et al., 2015; Zhang et al., 2012). Gene Ontology (GO) databases for Biological Processes (BP) were applied for gene annotation. All enriched terms were selected using the right-sided hypergeometric test with Benjamini-Hochberg (BH) adjustment at *p* < 0.05. Term fusion was activated for all protein clusters. The network was designed with a kappa score of at least 0.4. The ClueGO Layout was applied and manually adjusted in a minimal way.

## 2.7. Clams contamination

### 2.7.1. Sampling and dissections of clams

Sampling and dissections of clams for analysis of tissue contamination were performed on t<sub>10</sub> (1<sup>st</sup> December; ≈ 02:00 PM; GMT + 1). Five clams exposed to crude oil (OIL) and five clams exposed to natural variations only (CTRL) were dissected immediately after collection from artificial streams. Gills (*n* = 5) and muscles plus ganglia pool (*n* = 5) were stored at -20 °C until analysis was performed.

Tissue contamination levels were analysed at t<sub>10</sub> for analytical reasons (low tissue mass and low expected concentrations levels). However, based on literature data, it was assumed that contamination levels by PAH at t<sub>10</sub> overestimate the contamination level at t<sub>3</sub> (Foster et al., 1987; Liu et al., 2014; Mason, 1988; Pruell et al., 1986; Stegeman and Teal, 1973; van Haren et al., 1994).

### 2.7.2. PAH analysis

In brief, 21 PAH (acenaphthylene, acenaphthene, anthracene, benzo(a)anthracene, benzothiophene, benzo(b)fluoranthene, benzo(g,h,i)perylene, benzo(k)fluoranthene, benzo(e)pyrene, benzo(a)pyrene, biphenyl, chrysene, dibenzo(a,h)anthracene, dibenzothiophene, fluoranthene, fluorene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, naphthalene, perylene, phenanthrene, and pyrene), among which, 16 listed as priority pollutants by the US EPA (United States Environmental Protection Agency; underlined in the list) were analysed in muscles plus ganglia pool (*n* = 5) and gills (*n* = 5) of five clams per condition (Miserazzi et al., 2020). The analyses were performed by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-tandem mass spectrometry (SBSE-GC-MS/MS) as described in Lacroix et al. (2014). Analytes were quantified relative to deuterated compounds using a calibration curve ranging from 0.01 ng to 10 ng per bar. Two compounds, benzo(b)fluoranthene and benzo(k)fluoranthene, were quantified as a sum named benzo(b + k)fluoranthene due to poor resolution. The limits of quantification (LOQ) were calculated by the calibration curve method

(Shrivastava and Gupta, 2011), and the limit of detection (LOD) was estimated by dividing the LOQ by 3.

### 2.7.3. Statistics

Tissue contamination data were processed with R software (R Core Team, 2016). After verification of normality and homoscedasticity of error terms, comparisons between the two independent variables were investigated using the non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney test. Statistical differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

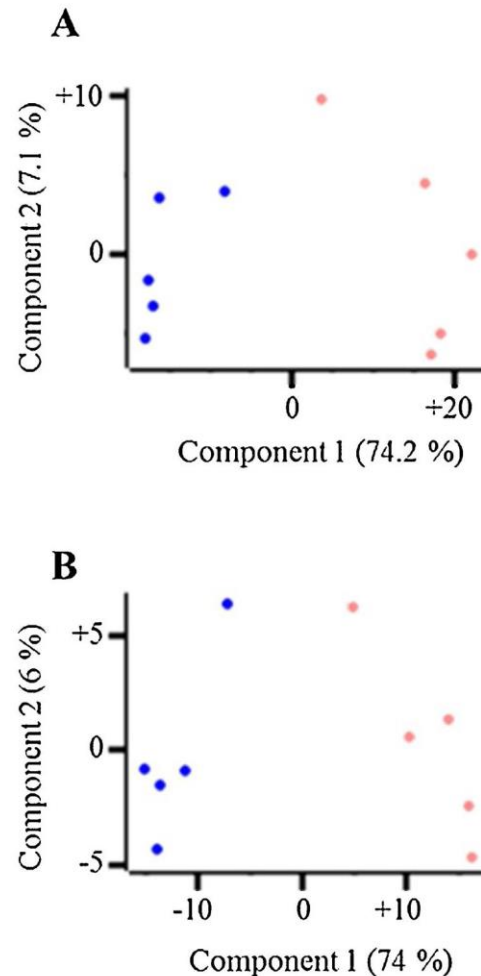
No mortality occurred during the entire experiment (acclimation period, reference period, exposure period and post-exposure period).

### 3.1. Behavioural disturbances and tissue contamination

The behaviour of clams was deeply modified by the presence of crude oil. It was characterised by three major changes: an increase of valve closure duration, VCD (Fig. 1A), a decrease of valve opening amplitude, VOA (Fig. 1B) and an increase of valve agitation index, VAI (Fig. 1C). The hourly VCD was 9.5 times greater in the presence of crude oil (Fig. 1A). The hourly VOA was 5.3 times lesser (Fig. 1B) and the hourly VAI was 2.8 times greater (Fig. 1C). The level of contamination in muscles plus ganglia pool and in gills after a 10 d exposure period is presented in Fig. 1D. All values are in the low range. The median contamination level in muscles plus ganglia pool was not different between exposed and control clams ( $6.1$  and  $7.4 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1} \text{ ww}$ ). In contrast, it was different in gills. It was  $70.2 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1} \text{ ww}$  in gills of OIL clams and  $18.9 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  in CTRL clams.

### 3.2. Analysis of proteomic changes

A total of 1860 proteins were quantified in muscles plus ganglia pool and 5469 in gills. Among them, in the muscles plus ganglia pool, 139 showed a significant difference between the both conditions (7.5%;  $\text{FDR} < 0.2$ ) and 144 in gills (2.6%;  $\text{FDR} < 0.25$ ). As an exploratory analysis, Principal Component Analyses (PCA) was applied to significantly changing proteins. PCA showed a clear individualisation according to the experimental conditions, which explained 81.3% (Component 1, 74.2% + Component 2, 7.1%) variability in the muscles plus ganglia pool (Fig. 2A) and 80% (Component 1, 74% + Component 2, 6%) in the gills (Fig. 2B). Thereafter, we turned to functional analyses (hierarchical clustering and corresponding pathways analysis) to explore observed differences (Figs. 3A, B, C and Fig. 4A, B, C). Firstly, in agreement with the PCA, upper vertical clustering shows a clear segregation between crude oil and control conditions (OIL, five left-side columns; CTRL, five right-side columns) in muscles plus ganglia pool (Fig. 3A) and in gills (Fig. 4A). In hierarchical clustering, each horizontal line represents one differentially expressed protein. In both tissues, horizontal hierarchical clustering revealed two major row clusters: in the upper ones, proteins were less abundant in the presence of crude oil and in the lower one, proteins were more abundant in the presence of crude oil. Fig. 3A shows that in muscles plus ganglia pool, 90 proteins (65% of the total) were less abundant and 49 proteins (35% of the total) were more abundant in crude-oil exposed clams. In contrast, in gills (Fig. 4A), only 59 proteins (i.e. 41% of the total) were less abundant in crude-oil exposed clams while 85 proteins (59% of the total) were more abundant. Thereafter, a functional analysis was performed for each row cluster within the two tissues (Figs. 3B, 3C and 4B, 4C). In muscles plus ganglia pool, biological processes associated to less abundant proteins (Fig. 3B) were relatively numerous. There were essentially related to metabolic and/or cellular activities namely generation of precursor metabolites and energy, small molecule metabolic process, organonitrogen compound metabolic process, cellular ketone metabolic process, alpha-ketoacid dehydrogenase activity, proteolysis

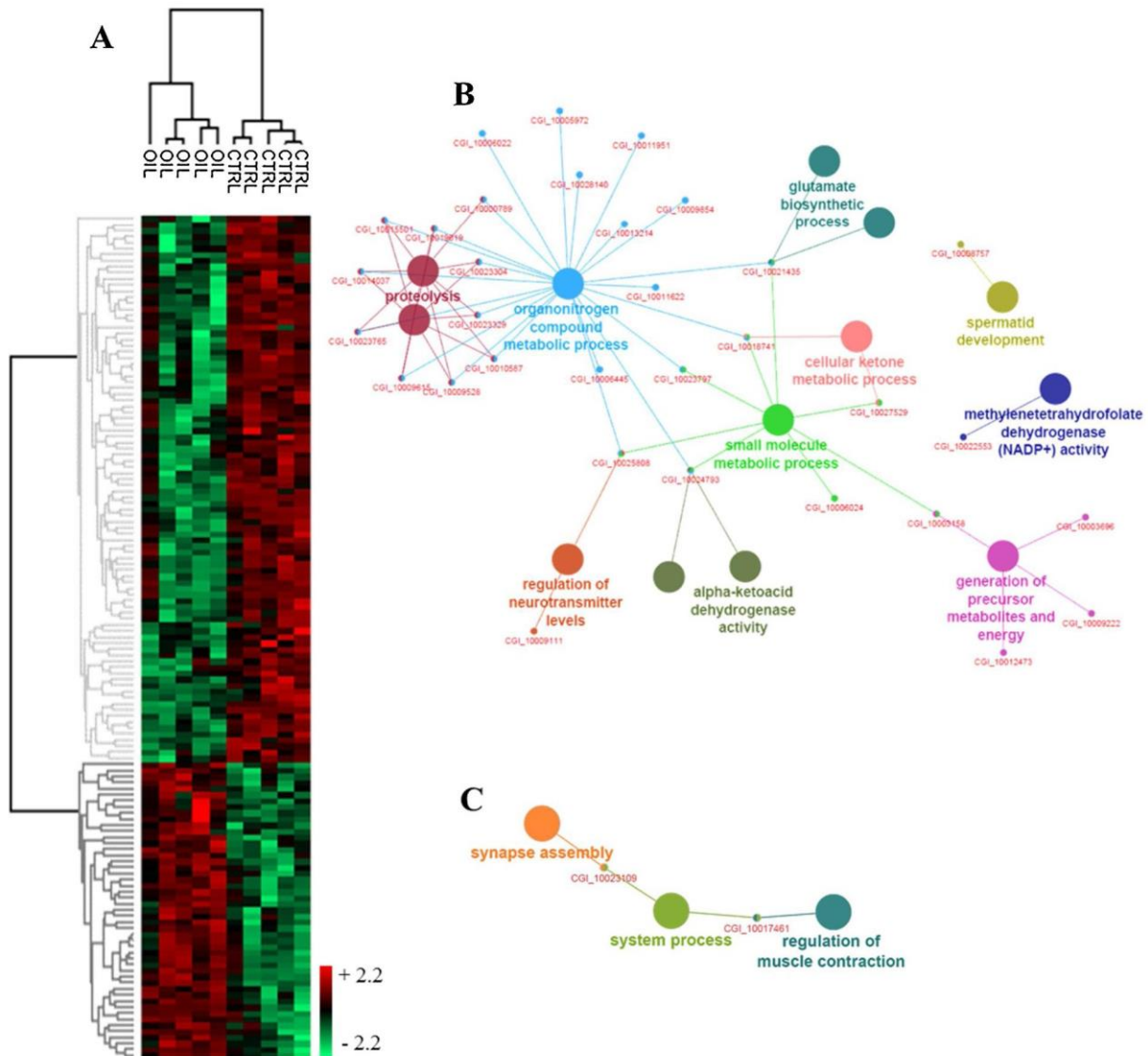


**Fig. 2.** Principal Component Analysis. PCA performed with significant proteins in (A), muscles plus ganglia pool and (B) gills. It clearly separates the five OIL clams (exposed to crude oil; pink circles, on the right) from the five CTRL clams (control conditions; blue circles, on the left).

and glutamate biosynthetic process. GO enrichment analysis also indicated that this set of proteins was associated with the biological regulation of neurotransmitter levels. The most abundant proteins were statistically represented through the categorical term system process, which makes it possible to establish a bridge between regulation of muscle contraction and nervous system through the term synapse assembly (Fig. 3C). The less abundant proteins in oil-contaminated gills were statistically enriched only through two biological processes, negative regulation of endopeptidase activity and regulation of hydrolase activity (Fig. 4B). The functional network associated to proteins more abundant in contaminated gills was relatively richer and the GO terms were also mainly related to metabolic and/or cellular processes (Fig. 4C). More precisely, GO terms were related to cell signalling pathway with activation of MAPKK activity, to energy or nucleotide metabolism with tricarboxylic acid cycle, GTP metabolic process or nucleoside diphosphate phosphorylation. Finally, GO terms were also related to cell signal transduction with adenylate cyclase-modulating G-protein coupled receptor signalling pathway and to protein processing with the term protein polymerization.

## 4. Discussion

In the current study, we used three complementary approaches to further increase analytical and empirical understanding of crude oil-induced behaviour in the Asian clam *C. fluminea*: behaviour, PAH



**Fig. 3.** Differential proteomic analysis performed in muscles plus ganglia pool of crude oil exposed clams vs control. (A) Hierarchical clustering with significant proteins (FDR < 0.2). Normalized z-scored protein abundance are depicted in red (relatively higher abundance) and green (relatively lower abundance). Two row clusters of protein profiles are highlighted in light and dark grey. (B) Functional network of the proteins with relatively lower abundance in OIL clams ( $p < 0.05$ ). (C) Functional network of proteins with relatively higher abundance in OIL clams ( $p < 0.05$ ). The dashed line separates the analyses between lower and higher abundances.

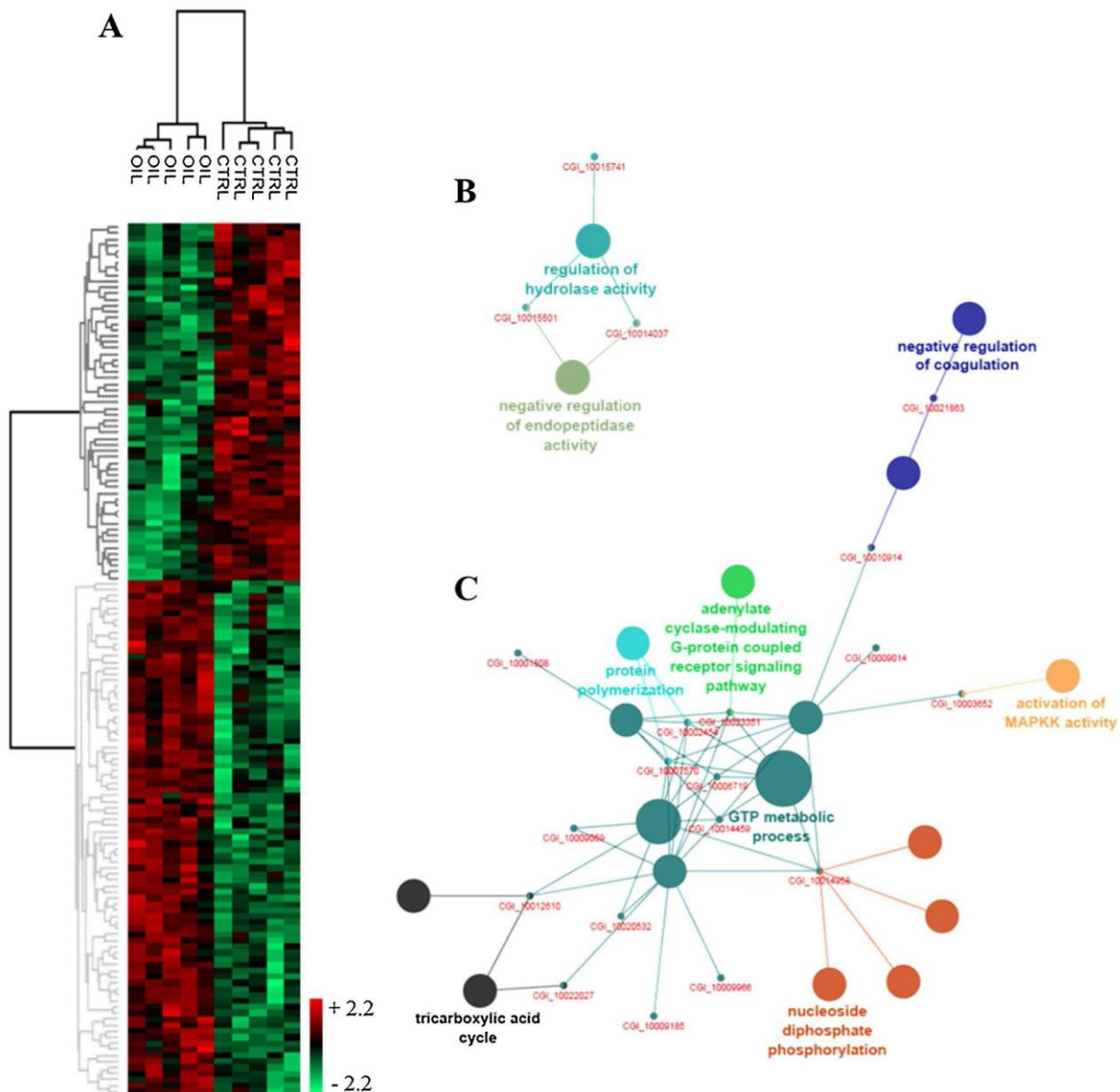
contamination and proteomics. The behavioural response of clams exposed to crude oil was unequivocal. It was characterised by a significant increase of VCD, a significant decrease of VOA and a significant increase of VAI (Figs. 1A, 1B, 1C). We sought, through a proteomic analysis focused on two target tissues (the adductor muscles – pedal retractor muscles – visceral ganglia – cerebral ganglia pool and the gills), to explore the underlying disturbances that occur in the internal medium of exposed clams. To complete the analysis, we used data on PAH accumulation that showed significant contamination in gills but no contamination in muscles plus ganglia pool. Importantly, these contamination levels were in the low range of literature data (Webster et al., 2006). The major proteomic changes included a decrease of metabolic and/or cellular processes and nervous functions in muscles plus ganglia pool with a minor toxicological impact, and an increase of metabolic and/or cellular processes in gills with a higher toxicological impact.

#### 4.1. Non-replicated stream conditions

In this work, we have used non-replicated stream conditions due to logistical problems but we individually analysed five Asian clams exposed to crude oil in one stream and five other individuals exposed to control conditions in another stream. A PCA analysis showed first a clear individualisation between streams (Figs. 2A and B). Then we turned to functional analysis and upper vertical clustering that also showed a clear segregation between crude oil and control streams (Figs. 3A and Fig. 4A). Thus, despite the use of only one stream per treatment, that is a standard situation in field sampling, our data set shows the amplitude of individual variations and strongly supports significant differences between oil and control conditions.

#### 4.2. The target tissues

We focused our interest on the muscles plus ganglia pool and the gills for evaluating their functional role in setting out Asian clam's behaviour.



**Fig. 4.** Differential proteomic analysis in gills of crude oil exposed clams vs control. (A) Hierarchical clustering with significant proteins (FDR < 0.25). Normalized z-scored protein abundance are depicted in red (relatively higher abundance) and green (relatively lower abundance). Two row clusters of protein profiles are highlighted in light and dark grey. (B) Functional network of proteins with a relatively lower abundance in OIL clams ( $p < 0.05$ ). (C) Functional network of proteins with a relatively higher abundance in OIL clams ( $p < 0.05$ ). The dashed line separates analyses between lower and higher abundances.

The pool was composed of the anterior and posterior adductor muscles (which is a mix of striated and smooth muscles), anterior and posterior pedal retractor muscles, paired cerebral ganglia, paired visceral ganglia and its innervations to muscles (Kraemer and Lott, 1977; Britton and Morton, 1982). In *C. fluminea*, cerebral ganglia and visceral ganglia are two of the three major ganglia in the nervous system. Cerebral ganglia lie flat against the anterior pedal muscles while visceral ganglia nestle in posterior pedal muscles. Visceral ganglia innervate gills through a gill nerve while cerebral ganglia are connected to the digestive system (oesophagus, stomach, intestine, etc.) and pedal ganglia. The visceral and cerebral ganglia are also interconnected with each other. In bivalves, adductor muscles are mechanical effectors of valve movements with the elastic ligament situated along the edge of the hinge between the valves. When these muscles are impacted, the valve activity is expected to be modified and *vice versa*. The fast muscle (or striated muscle) is responsible for rapid contractions, while the slow muscle (or smooth muscle) is responsible for the state of catch, which is

the maintenance of valve closure for long periods with minimal energy demand (Sun et al., 2018).

Gills were sampled because they are, together with the inhalant siphon and the mantle edge, on the frontline during any contamination. Gill tissue is particularly complex, and composed of respiratory exchange tissue, ion exchange tissue, immune tissue, ciliary and muscles for water movements and feeding purposes (Britton and Morton, 1982; Gainey et al., 2003; Medler and Silverman, 2001; Mommsen, 1984). It is richly innervated via a branchial nerve originating from the visceral ganglia (Britton and Morton, 1982; Kraemer and Lott, 1977).

#### 4.3. Disturbances in muscles + ganglia pool

##### 4.3.1. Proteins with a lower abundance

**4.3.1.1. Metabolic activity.** Within the muscles plus ganglia pool (Fig. 3), proteins with a lower abundance were a majority. These proteins were mainly involved in metabolic processes. This strongly

suggests a decrease in metabolic activity, which is consistent with the change in behavioural activity. Indeed, in exposed clams, there was an increase in valve closing duration and thus an increase in the catch mechanism. In bivalves, catch is a passive state of the smooth muscle that allow valves to remain closed for long periods with minimal energy consumption (Galler, 2008; Yamada et al., 2013). The valve opening amplitude was also lower, which is consistent with the decline in valve activity. Altogether, this behaviour represents probably a defence mechanism to limit exposure of the inner soft tissues. With regard to the VAI, exposed clams were more agitated when opened. However, valve closing duration was significantly greater in exposed clams, suggesting that transient valve agitation behaviour has a limited weight in the overall energetic balance of valve activity.

**4.3.1.2. Neurotransmitters.** Taking a close look at the lower abundant proteins impacted in the muscles plus ganglia pool, it can be seen that some elements were linked to the metabolism of glutamate. Glutamate is a major metabolic hub involved in diverse processes (Walker and van der Donk, 2016) and, is an excitatory neurotransmitter, whose deregulation can lead to some toxicity in the nervous system (Choi, 1988; Wu and Wang, 2010). The network analysis of lower abundant proteins highlights the disruption of the "glutamate biosynthetic process" and, interestingly, glutamate synthase (FC, 0.018; FDR, 0.082) was found among the top five of less abundant proteins in this tissue pool. Its decrease decreases glutamate synthesis (from 2-oxoglutarate, an intermediate of the tricarboxylic acid cycle), which is in agreement with results from Müller et al. (2018) on oysters. These authors observed a decrease in glutamate 4 receptor abundance in gill microsomes of oysters *Crassostrea brasiliana* exposed during 24 h to water contaminated by diesel fuel.

With regard to the regulation of neurotransmitter levels, we identified two other proteins through network analysis of lower abundant proteins: synaptotagmin-1 (FC, 0.12; FDR, 0.187) and 4-aminobutyrate aminotransferase or gamma-aminobutyric acid (GABA) transaminase (FC, 0.08; FDR, 0.161). Synaptotagmin-1 plays an important role in neurotransmission by being a major sensor of  $Ca^{2+}$  within excitatory synapses (Brose et al., 1992; Chapman, 2002). A decrease of synaptotagmin-1 suggests a decrease of excitatory synapse activity. This protein is also implicated, but to a lesser extent, in the transmission of the nervous message within GABAergic neurons (Kerr et al., 2008). GABA transaminase allows the synthesis of glutamate from 2-oxoglutarate - an intermediate of the tricarboxylic acid cycle - and from GABA. Its lower abundance is consistent with the lower abundance of glutamate synthase, thus supporting the hypothesis of a decrease in glutamate synthesis. Finally, this protein is a key enzyme in GABA catabolism (Walls et al., 2015), a neurotransmitter that inhibits the nervous system of vertebrates and invertebrates (Lunt, 1991; Miller, 2019). We suggest that inhibition of this enzyme, which leads to increased levels of GABA (inhibitor neurotransmitter; Abel and Kohli, 1999), and inhibition of glutamate synthase, responsible for glutamate synthesis (excitatory neurotransmitter), should contribute to the decrease in clam's activity in the presence of crude oil. Indeed, whether in vertebrates or invertebrates, GABA is able to regulate locomotor patterns by modulating underlying neural circuits (Shen et al., 2016). In addition, the change in abundance of the enzyme GABA transaminase in the brain could cause mitochondrial muscle disruption, independent of the GABAergic system. Besse et al. (2015) showed that a deficiency of this enzyme in the brain can cause mitochondrial DNA (mtDNA) depletion, a syndrome associated with various symptoms including muscle weakness and hypotonia. Note, all this forms a coherent whole with the tissue pool analysed and the decrease in behavioural activity.

**4.3.1.3. Mitochondrial process.** The most impacted protein, in the muscles plus ganglia pool, is the ClpX protein (FC, 0.001; FDR, 0.024). This protein belongs to the AAA + superfamily (ATPases Associated with various cellular Activities), a family of proteins that

is found in all kingdoms of life and participates in a wide range of biological processes (Ammelburg et al., 2006; Ogura and Wilkinson, 2001; Sysoeva, 2017). More specifically, ClpX protein is involved in dependent ATP proteolysis by being a component of Clp proteases (Baker and Sauer, 2012). It is involved in mitochondrial processes by affecting the distribution and morphology of mtDNA nucleoids (Bogenhagen et al., 2008; Kasashima et al., 2012; Ogura and Wilkinson, 2001). Its lower abundance highlights an effect on proteolysis, in a coherent way with the network analysis of the lower abundant proteins in the muscles plus ganglia pool as well as a potential mitochondrial dysfunction due to the stress generated on the mtADN. In turn, this mitochondrial dysfunction can be apprehended by network analysis, which shows a decrease in the "generation of precursor metabolites and energy". The three proteins associated with this process within the network were electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase (FC, 0.689; FDR, 0.147), an enzyme from the respiratory electron transport chain, succinyl-CoA ligase[GDP-forming] subunit beta (FC, 0.06; FDR, 0.104), a tricarboxylic acid cycle enzyme, and xanthine dehydrogenase (FC, 0.107; FDR, 0.168), an enzyme leading to the generation of reactive oxygen species (ROS). A lower abundance of xanthine dehydrogenase has already been shown in gills of oysters *Crassostrea gigas* exposed to various stresses: thermal stress, hypo-salinity and aerial exposure (Zhang et al., 2015). The lower expression of these three proteins suggests a decrease in mitochondrial activity, a decrease in number of mitochondria, or both simultaneously. Recently, several studies highlighted the effect of crude oil on mitochondria, particularly concerning their role in aerobic metabolism (Johansen and Esbaugh, 2019; Kirby et al., 2019; Salazar-Coria et al., 2019). Following a 24 h exposure period to crude oil, Kirby et al. (2019) proposed that crude oil may alter the mitochondrial respiratory chain, thus the ATP supply of myocardial cells in mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). This dysfunction was also implied in the impairment of cardiac muscle function observed in the presence of oil in fish (Cox et al., 2017; Johansen and Esbaugh, 2019; Kirby et al., 2019; Nelson et al., 2016, 2017;). We suggest that the dysfunction of mitochondrial processes within the muscles plus ganglia pool could be at the origin of the decrease, or at least, the alteration in muscular and nervous function of clams, and therefore, by extension, in their behavioural activity.

#### 4.3.2. Proteins with a higher abundance

**4.3.2.1. Neuromuscular synapses.** The detail of higher abundant proteins impacted in the muscles plus ganglia pool shows some disturbances in the nervous system through the "synapse assembly" process as well as a disturbance of the muscular system with the "regulation of muscle contraction" processes. The alteration of the "synapse assembly" process indicates a disruption in the formation of synapses, thus in the potential number of mature and functional synapses. Disruption of muscle contraction involved the disruption of any process able to modulate frequency and/or the extent of muscle activity. The protein linking the synapse assembly process and the system process was neurexin 1 $\alpha$ . Neurexins are transmembrane proteins located mainly at synaptic extremities of neurons and are involved in neurotransmission and formation of synapses (Reissner et al., 2013). Kang et al. (2008) found that  $\alpha$ -neurexins promote recruitment and stabilisation of GABAergic synapses. This again supports the role of GABA activity in the global increase of valve closing duration in oil-contaminated clams. Concerning the regulation of muscle contraction, the protein involved was troponin T of skeletal muscle. In the adductor muscle of bivalve molluscs, striated muscle is responsible for rapid valve contractions (Chantler, 2006; Millman, 1964; Sun et al., 2018). Within this tissue, troponin T will bind troponin I and troponin C to tropomyosin (Farah and Reinach, 1995; Tanaka et al., 2008; Zot and Potter, 1987). To conclude, the whole data set above showed that both nervous and muscle tissues were impacted by the inspired crude oil.

#### 4.3.3. Stress markers and oxidative stress

In their meta-analysis of the literature, Anderson et al. (2015) identified the top five genes most commonly affected by environmental stressors. In the category "intracellular stress and detoxification", we find genes encoding superoxide dismutase, metallothioneins, glutathione-S-transferases, heat shock protein (HSP) 70's and glutathione peroxidases. Among these key stress markers, in the muscles plus ganglia pool, three were present: a chaperone protein, the heat shock cognate 71 kDa protein (FC, 1.58; FDR, 0.053) and two enzymes involved in defence against oxidative stress, superoxide dismutase Cu/Zn (FC, 16.5; FDR, 0.151) and glutathione peroxidase (FC, 0.119; FDR, 0.196). Cu/Zn superoxide dismutase catalyses the transformation of the superoxide anion into hydrogen peroxide, outside of the mitochondrial matrix. Its higher abundance would indicate an excess of the superoxide anion (despite global decrease in metabolic activity). Glutathione peroxidase catalyses the transformation of hydrogen peroxide into water within the mitochondrial matrix. Its lower abundance consequently indicates either a deficit in hydrogen peroxide within the mitochondrial matrix or a failure in reducing hydrogen peroxide toxicity. Regardless, the respective abundance of these two enzymes suggests an excess of hydrogen peroxide, a key metabolite of oxidative stress. Hydrogen peroxide is a messenger of the redox signal at the enzymatic and transcriptional levels (Sies, 2017). It is able to pass through biological membranes, affect other molecules (lipids, proteins, DNA), whether near or distant from its original site, and interfere with other biochemical reactions (Tomanek, 2015). In a manner coherent with the literature (Baussant et al., 2009; Boutet et al., 2004; Jiang et al., 2017; López-Landavery et al., 2019 for examples in bivalves), there was a disruption of enzymes involved in defence against oxidative stress in response to crude oil exposure.

#### 4.3.4. A specific presence of PAH in the nervous system?

Multiple enzymatic responses to oxidative stress were shown in the muscle plus ganglia pool despite an absence of local PAH accumulation in this specific tissue set. However, the non-significant accumulation in the muscles plus ganglia pool (Fig. 1D) should not be directly interpreted as an absence in ganglia. Indeed, the fraction of nervous tissue was minor in our samples. An unequal PAH distribution between muscle and ganglia could occur. Lipid content is not the only biological determinant governing PAH accumulation in tissue (Frapiccini et al., 2018), but the nervous tissue is made of  $\approx 80\%$  of lipids in invertebrates and vertebrates (McCull and Rossiter, 1951), while there are only  $\approx 4\%$  of lipids in the adductor muscles in bivalve molluscs (Dongre and Sonwane, 2014). We suggest in bivalves, that the nervous tissue could be a PAH sink as in fishes. In the latter, the brain accumulates largest quantities of PAH by comparison to muscles (Wu et al., 2012; Xu et al., 2011). However, considering the low amount of tissue available for PAH analysis, the latter remains an open challenge in small bivalve molluscs such as *Corbicula*.

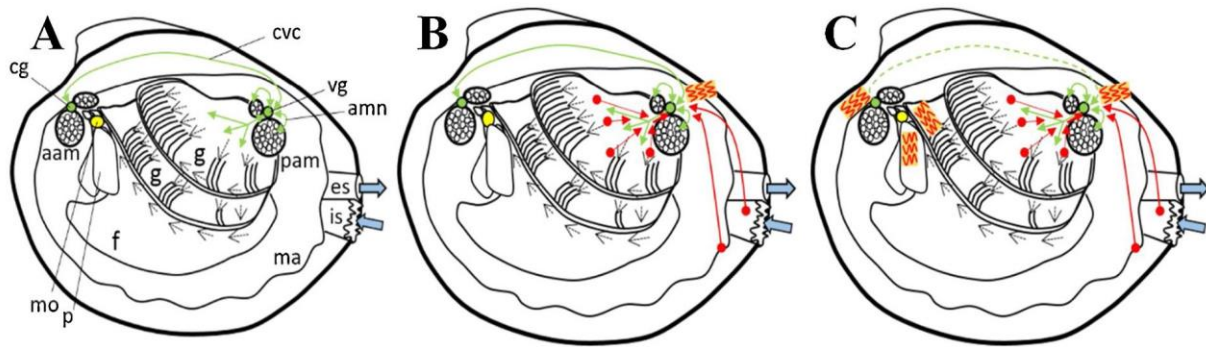
#### 4.4. Disturbances in gills

In gills, where accumulation of PAH was highly significant, there was a deregulation of two HSPs 70's only: 12A (FC, 1.23; FDR, 0.114) and 12B (FC, 0.079; FDR, 0.153), that are among the top five most commonly affected genes in the category "intracellular stress and detoxification" listed by Anderson et al. (2015). HSP plays a key role in protein regulation and were considered proteins produced or deregulated by all cellular organisms in a stressful situation (Roberts et al., 2010). However, network analysis of higher abundant proteins also shows the activation of MAPKK activity (mitogen-activated protein kinase kinase; Fig. 4). MAPKK is part of the MAPK (mitogen-activated protein kinase) phosphorelay system, a group of serine/threonine kinases that participate in gene expression regulation, mitosis, movement, metabolism and apoptosis (Johnson and Lapadat, 2002). Multiple studies have highlighted the disruption of this pathway in the presence

of hydrocarbons or other pollutants in aquatic organisms (Burlando et al., 2006; Châtel et al., 2011; Won et al., 2016). In addition, we were able to notice the presence of other proteins reflecting (i) the disruption of the cell cycle, (ii) the disruption of the apoptotic mechanism or (iii) the accumulation of potential DNA damage. RecQ1, a protein that plays an important role in cellular DNA metabolism (Wu and Brosh, 2010) by being involved in maintaining genome stability, was lower abundant in exposed clams (FC, 0.064; FDR, 0.248). There was also the lower abundance (FC, 0.041; FDR, 0.193) of Cdc5-like protein, a DNA-binding protein involved in the regulation of the mitotic cell cycle and in DNA damage response (Bernstein and Coughlin, 1998; Mu et al., 2014). Lastly, caspase 7, a protease involved in programmed cell death and the inflammatory process (Lamkanfi and Kanneganti, 2010), was lower abundant (FC, 0.427; FDR, 0.223). Finally, there was the higher abundance of the tumour protein D54 (FC, 1.90; FDR, 0.218) which belongs to the protein family D52 (Nourse et al., 1998). Proteins in this family, in addition to being involved or suspected of being involved in many cellular processes, are frequently overexpressed in multiple cancers where they are thought to play a role in cell proliferation and thus promote tumour progression (Boutros et al., 2004). In addition, network analysis of higher abundant proteins in gills show a general increase in energy and nucleotide metabolism, an increase in transduction of cellular signals and an increase in protein processing. The analysis thus shows an increase in cellular activity in gills including a substantial mobilisation of energy resources. This increase may be necessary to promote cell maintenance in response to crude oil exposure and PAH accumulation in gills of clams after a 3 d exposure period. This general metabolic change could also promote or support the potential carcinogenesis process initiated in this tissue (Lunt and Fendt, 2018).

#### 4.5. Mechanisms that may explain the behavioural response to crude oil

To conclude and propose a link between behavioural observations, proteome modifications and PAH contamination reported in this study, we suggest two mechanisms or scenarios to relate behavioural disturbances to those of the internal medium (Figs. 5A, 5B, 5C). Before that, one must recall that in clams, the first tissue facing contaminated water are the inhalant siphon and to a lesser extent the rest of the mantle edge (Fig. 5A). These areas have many sensory papillae or tentacles capable of tasting the ambient water and thus leading to the valve closure (Britton and Morton, 1982). In the first scenario (Fig. 5B), the routine activity of visceral ganglia would be disrupted first by nervous information generated by the contact of the contaminants with sensory papillae of the inhaling siphon and/or mantle edges and then the contaminated gills. In a second step, the nervous activity of visceral ganglia could be disrupted by its own specific contamination. According to proteomic analyses within the muscles plus ganglia pool, the list of disturbances includes a decrease of nervous and metabolic activity. We propose that the decrease of nervous activity in visceral ganglia participated to decrease metabolic activity in muscles, to decrease valve activity and contributed to the catch mechanism. In the second scenario (Fig. 5C), we include a neuromodulatory role for cerebral ganglia. The nervous activity of the cerebral ganglia could also be disrupted by its own specific contamination. Moreover, cerebral ganglia have a special location near the mouth, which exposes them more to hydrocarbon compounds. Indeed, all contaminated mucus collected on gills converges to the mouth and then to the cerebral ganglia area, which could be affected by a passive diffusion of hydrocarbons. The decrease in nervous activity of the cerebral ganglia, including some kind of narcosis, would cause an additional decrease in nervous activity of visceral ganglia via a decrease or blockage of neuromodulation (mechanism reviewed by Hamood and Marder, 2014). This would strengthen the effects already presented in the first scenario on visceral ganglia, muscles and thus valve activity.



**Fig. 5.** Schematic diagrams that potentially explain behavioural changes in crude oil exposed Asian clams. (A) Background information on the anatomy of *C. fluminea* and two nonexclusive disturbance scenarios (B and C) explaining behavioural changes reported in this work, see text. aam, anterior adductor muscle; cg, cerebral ganglia; cvc, cerebro-visceral commissure; es, exhalant siphon; f, foot; g, gills; is, inhalant siphon; ma, mantle; mo, mouth; p, labial palp; pam, posterior adductor muscle; vg, visceral ganglia. Green arrows, efferent nerves from visceral ganglion to adductor muscles, gills and between visceral and cerebral ganglia. Red arrows, afferent nerves from inhalant siphon, mantle edge and gills to visceral ganglia. Wavy red lines represent the presence of hydrocarbon compounds directly acting on ganglia.

## Funding

This paper is the result of an ongoing collaboration between the UMR CNRS 5805 EPOC (University of Bordeaux and CNRS) and TOTAL, and aims to develop HFNI valvometry as a reliable technique applicable in the oil and gas industry, both offshore, along the coastline and in freshwaters. TOTAL Company personnel participated in collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report and in the decision to submit the article for publication. Financial support was received through CNRS, the University of Bordeaux, the Region Nouvelle Aquitaine and TOTAL (Project number: Ref TOTAL, FR00008208; AST, Aquitaine Science Transfert, AST 2015-336).

## CRedit authorship contribution statement

**A. Miserazzi:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **M. Perrigault:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization. **M. Sow:** Data curation, Formal analysis, Software, Supervision, Validation, Visualization. **C. Gelber:** Investigation, Methodology, Validation. **P. Ciret:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Supervision, Validation. **A.M. Lomenech:** Formal analysis, Methodology, Validation. **J.M. Dalens:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Validation. **C. Weber:** Formal analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Validation. **S. Le Floch:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Supervision, Validation. **C. Lacroix:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Validation. **P. Blanc:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing - review & editing. **J.C. Massabuau:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing.

## Declaration of Competing Interest

This work was partially supported by a grant from the TOTAL oil company but we certify that it did not inappropriately influence (bias) the present work by affecting our objectivity.

## Acknowledgments

The authors wish to thank B. Etcheverria for bivalve care, D. Tran

and S. Claverol for fruitful discussions and A. Bertucci for support in bioinformatics.

## References

- Abel, M.S., Kohli, N., 1999. GABA-transaminase antisense oligodeoxynucleotide modulates cocaine- and pentylenetetrazol-induced seizures in mice. *Metab. Brain Dis.* 14, 253–263.
- Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral disturbances: the missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 15, 87–110. <https://doi.org/10.1080/10807030802615543>.
- Ammelburg, M., Frickey, T., Lupas, A.N., 2006. Classification of AAA + proteins. *J. Struct. Biol.* 156, 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.05.002>.
- Anderson, K., Taylor, D.A., Thompson, E.L., Melwani, A.R., Nair, S.V., Raftos, D.A., 2015. Meta-analysis of studies using suppression subtractive hybridization and microarrays to investigate the effects of environmental stress on gene transcription in oysters. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118839>.
- 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.* <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00187>.
- Baker, T.A., Sauer, R.T., 2012. ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, AAA ATPases: structure and function* 1823, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2011.06.007>.
- Bassères, A., Tramier, B., 2001. Characterisation of the impact of aqueous industrial waste in mesocosms: biological indicators and pilot streams. *Water Sci. Technol.* 44, 135–143. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0763>.
- Baussant, T., Bechmann, R.K., Taban, I.C., Larsen, B.K., Tandberg, A.H., Bjørnstad, A., Torgrimsen, S., Naevdal, A., Øysaet, K.B., Jonsson, G., Sanni, S., 2009. Enzymatic and cellular responses in relation to body burden of PAHs in bivalve molluscs: a case study with chronic levels of North Sea and Barents Sea dispersed oil. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1796–1807. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.08.007>.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 57, 289–300.
- Bernstein, H.S., Coughlin, S.R., 1998. A mammalian homolog of fission yeast Cdc5 regulates G2 progression and mitotic entry. *J. Biol. Chem.* 273, 4666–4671. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.8.4666>.
- Besse, A., Wu, P., Bruni, F., Donti, T., Graham, B.H., Craigen, W.J., McFarland, R., Moretti, P., Lalani, S., Scott, K.L., Taylor, R.W., Bonnen, P.E., 2015. The GABA transaminase, ABAT, is essential for mitochondrial nucleoside metabolism. *Cell Metab.* 21, 417–427. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.02.008>.
- Bhattacharyya, S., Klerks, P.L., Nyman, J.A., 2003. Toxicity to freshwater organisms from oils and oil spill chemical treatments in laboratory microcosms. *Environ. Pollut.* 122, 205–215. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00294-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00294-4).
- Bindea, G., Galon, J., Mlecnik, B., 2013. CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics* 29, 661–663. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt019>.
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.-H., Pagès, F., Trajanoski, Z., Galon, J., 2009. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25, 1091–1093. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101>.
- Bogenhagen, D.F., Rousseau, D., Burke, S., 2008. The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J. Biol. Chem.* 283, 3665–3675. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708444200>.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, 147–157.



- <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.12.027>.
- Boutros, R., Fanayan, S., Shehata, M., Byrne, J.A., 2004. The tumor protein D52 family: many pieces, many puzzles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 1115–1121. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.112>.
- Britton, J.C., Morton, B., 1982. A dissection guide, field and laboratory manual for the introduced bivalve *Corbicula fluminea*. *Malacological Review*.
- Brose, N., Petrenko, A.G., Sudhof, T.C., Jahn, R., 1992. Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256, 1021–1025. <https://doi.org/10.1126/science.1589771>.
- Burlando, B., Berti, E., Viarengo, A., 2006. Effects of seawater pollutants on protein tyrosine phosphorylation in mussel tissues. *Aquatic Toxicology, The Stavanger Workshop Biological Effects of Environmental Pollution (BEEP) in marine coastal ecosystem* 78, S79–S85. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.020>.
- Cailleaud, K., Bassères, A., Gelber, C., Postma, S., Schure, A.T.M., Leonard, P.E.G., Redman, A.D., Whale, G.F., Spence, M.J., Hjort, M., 2019. Investigating predictive tools for refinery effluent hazard assessment using stream mesocosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 38, 650–659. <https://doi.org/10.1002/etc.4338>.
- Campos, A., Tedesco, S., Vasconcelos, V., Cristobal, S., 2012. Proteomic research in bivalves: towards the identification of molecular markers of aquatic pollution. *J. Prot. Special Issue: Farm Animal Prot.* 75, 4346–4359. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.027>.
- Chantler, P.D., 2006. Scallop adductor muscles: structure and function. Chapter 4 In: Shumway, S.E., Parsons, G.J. (Eds.), *Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, pp. 229–316. [https://doi.org/10.1016/S0167-9309\(06\)80031-1](https://doi.org/10.1016/S0167-9309(06)80031-1).
- Chapman, E.R., 2002. Synaptotagmin: a Ca<sup>2+</sup> sensor that triggers exocytosis? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 498–508. <https://doi.org/10.1038/nrm855>.
- Châtel, A., Talarmin, H., Hamer, B., Schröder, H.C., Müller, W.E.G., Dorange, G., 2011. MAP kinase cell signaling pathway as biomarker of environmental pollution in the sponge *Suberites domuncula*. *Ecotoxicology* 20, 1727–1740. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0706-1>.
- Chen, H., Zha, J., Liang, X., Bu, J., Wang, M., Wang, Z., 2013. Sequencing and de novo assembly of the asian clam (*Corbicula fluminea*) transcriptome using the illumina GAlx method. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079516>.
- Choi, D.W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623–634. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90162-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90162-6).
- Cox, G.K., Crossley, D.A., Stieglitz, J.D., Heuer, R.M., Benetti, D.D., Grosell, M., 2017. Oil exposure impairs in situ cardiac function in response to  $\beta$ -Adrenergic stimulation in cobia (*Rachycentron canadum*). *Environ. Sci. Technol.* 51, 14390–14396. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03820>.
- Danovaro, R., Carugati, L., Berzano, M., Cahill, A.E., Carvalho, S., Chenuil, A., Corinaldesi, C., Cristina, S., David, R., Dell'Anno, A., Dzhenbekova, N., Garcés, E., Gasol, J.M., Goela, P., Féral, J.-P., Ferrera, I., Forster, R.M., Kurekin, A.A., Rastelli, E., Marinova, V., Miller, P.I., Moncheva, S., Newton, A., Pearman, J.K., Pitois, S.G., Reñé, A., Rodríguez-Ezpeleta, N., Saggiomo, V., Simis, S.G.H., Stefanova, K., Wilson, C., Lo Martire, M., Greco, S., Cochran, S.K.J., Mangoni, O., Borja, A., 2016. Implementing and innovating marine monitoring approaches for assessing marine environmental status. *Front. Mar. Sci.* 3. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00213>.
- Dongre, S., Sonwane, D.L., 2014. Seasonal changes in lipid content, in the adductor muscles of cerebralectomized freshwater bivalve mussel *Lamellidens corrianus*. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* 9, 29–32. <https://doi.org/10.9790/3008-09122932>.
- Eganhouse, R.P., Calder, J.A., 1976. The solubility of medium molecular weight aromatic hydrocarbons and the effects of hydrocarbon co-solutes and salinity. *Geochim. Cosmochim. Acta* 40, 555–561. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(76\)90223-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(76)90223-4).
- Farah, C.S., Reinach, F.C., 1995. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *Faseb J.* 9, 755–767. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.9.7601340>.
- Foster, G.D., Baksi, S.M., Means, J.C., 1987. Bioaccumulation of trace organic contaminants from sediment by baltic clams (*Macoma balthica*) and soft-shell clams (*Mya arenaria*). *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 969–976. <https://doi.org/10.1002/etc.5620061209>.
- Frapiccini, E., Annibaldi, A., Betti, M., Polidori, P., Truzzi, C., Marini, M., 2018. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) accumulation in different common sole (*Solea solea*) tissues from the North Adriatic Sea peculiar impacted area. *Mar. Pollut. Bull.* 137, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.002>.
- Gainey, L.F., Walton, J.C., Greenberg, M.J., 2003. Branchial musculature of a venerid clam: pharmacology, distribution, and innervation. *Biol. Bull.* 204, 81–95. <https://doi.org/10.2307/1543498>.
- Galler, S., 2008. Molecular basis of the catch state in molluscan smooth muscles: a catchy challenge. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 29, 73. <https://doi.org/10.1007/s10974-008-9149-6>.
- Goldberg, E.D., Bowen, V.T., Farrington, J.W., Harvey, G., Martin, J.H., Parker, P.L., Risebrough, R.W., Robertson, W., Schneider, E., Gamble, E., 1978. The mussel watch. *Environ. Conserv.* 5, 101–125. <https://doi.org/10.1017/S0376892900005555>.
- Eds.). In: Green, J., Trett, M.W. (Eds.), *The Fate and Effects of Oil in Freshwater*. Springer, Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-1109-3>.
- Hamood, A.W., Marder, E., 2014. Animal-to-Animal variability in neuromodulation and circuit function. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 79, 21–28. <https://doi.org/10.1101/sqb.2014.79.024828>.
- Hartmann, J.T., Beggel, S., Auerswald, K., Stoeckle, B.C., Geist, J., 2016. Establishing mussel behavior as a biomarker in ecotoxicology. *Aquat. Toxicol.* 170, 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.06.014>.
- Jiang, M., Li, L., Li, Y., Shen, G., Shen, X., 2017. Oxidative stress in shellfish *sinonovacula constricta* exposed to the water accommodated fraction of zero sulfur diesel oil and Pingu crude oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 73, 294–300. <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0391-z>.
- Johansen, J.L., Esbaugh, A.J., 2019. Oil-induced responses of cardiac and red muscle mitochondria in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 219, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.02.003>.
- Johnson, G.L., Lapadat, R., 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911–1912. <https://doi.org/10.1126/science.1072682>.
- Käll, L., Canterbury, J.D., Weston, J., Noble, W.S., MacCoss, M.J., 2007. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat. Methods* 4, 923–925. <https://doi.org/10.1038/nmeth1113>.
- Kang, Y., Zhang, X., Dobie, F., Wu, H., Craig, A.M., 2008. Induction of GABAergic postsynaptic differentiation by  $\alpha$ -Neurexins. *J. Biol. Chem.* 283, 2323–2334. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703957200>.
- Kasashima, K., Sumitani, M., Endo, H., 2012. Maintenance of mitochondrial genome distribution by mitochondrial AAA+ protein ClpX. *Exp. Cell Res.* 318, 2335–2343. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.07.012>.
- Kerr, A.M., Reisinger, E., Jonas, P., 2008. Differential dependence of phasic transmitter release on synaptotagmin 1 at GABAergic and glutamatergic hippocampal synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 15581–15586. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800621105>.
- Kirby, A.R., Cox, G.K., Nelson, D., Heuer, R.M., Stieglitz, J.D., Benetti, D.D., Grosell, M., Crossley, D.A., 2019. Acute crude oil exposure alters mitochondrial function and ADP affinity in cardiac muscle fibers of young adult Mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 218, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.01.004>.
- Kraemer, L.R., Lott, S., 1977. Microscopic anatomy of the visceral mass of *Corbicula* (Bivalvia: sphaeriacea). *Bull. Amer. Malacol. Union* 1977, 48–56.
- Lacroix, C., Le Cuff, N., Receveur, J., Moraga, D., Auffret, M., Guyomarch, J., 2014. Development of an innovative and “green” stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–tandem mass spectrometry method for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota. *J. Chromatogr. A* 1349, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.094>.
- Lamkanfi, M., Kanneganti, T.-D., 2010. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 21–24. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.09.013>.
- Lemos, M.F.L., Soares, A.M.V.M., Correia, A.C., Esteves, A.C., 2010. Proteins in ecotoxicology - how, why and why not? *Proteomics* 10, 873–887. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900470>.
- Liu, D., Pan, L., Yang, H., Wang, J., 2014. A physiologically based toxicokinetic and toxicodynamic model links the tissue distribution of benzo[a]pyrene and toxic effects in the scallop *Chlamys farreri*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 493–504. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.01.005>.
- López-Landavery, E.A., Amador-Cano, G., Alejandri, N., Ramirez-Álvarez, N., Montelongo, I., Díaz, F., Galindo-Sánchez, C.E., 2019. Transcriptomic response and hydrocarbon accumulation in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) exposed to crude oil. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 225, 108571. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108571>.
- Lunt, G.G., 1991. GABA and GABA receptors in invertebrates. *Seminars in Neuroscience, GABA and Inhibitory Synaptic Transmission in the Brain* 3, 251–258. [https://doi.org/10.1016/1044-5765\(91\)90022-G](https://doi.org/10.1016/1044-5765(91)90022-G).
- Lunt, S.Y., Fendt, S.-M., 2018. Metabolism – a cornerstone of cancer initiation, progression, immune evasion and treatment response. *Curr. Opin. Syst. Biol.* 8, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.12.006>.
- Mason, R.P., 1988. Accumulation and depuration of petroleum hydrocarbons by black mussels. 1. Laboratory exposure trials. *South Afr. J. Mar. Sci.* 6, 143–153. <https://doi.org/10.2989/025776188784480582>.
- McColl, J.D., Rossiter, R.J., 1951. Lipids of the nervous system of the squid *Loligo pealii*. *J. Exp. Biol.* 28, 116–124.
- Medler, S., Silverman, H., 2001. Muscular alteration of gill geometry in vitro: implications for bivalve pumping processes. *Biol. Bull.* 200, 77–86. <https://doi.org/10.2307/1543087>.
- Miller, M.W., 2019. GABA as a neurotransmitter in gastropod molluscs. *Biol. Bull.* 236, 144–156. <https://doi.org/10.1086/701377>.
- Millman, B.M., 1964. Contraction in the opaque part of the adductor muscle of the oyster (*Crassostrea angulata*). *J. Physiol. (Paris)* 173, 238–262.
- Miserazzi, A., Sow, M., Gelber, C., Charifi, M., Ciret, P., Dalens, J.M., Weber, C., Le Floch, S., Lacroix, C., Blanc, P., Massabuau, J.C., 2020. Asiatic clam *Corbicula fluminea* exhibits distinguishable behavioural responses to crude oil under semi-natural multiple stress conditions. *Aquat. Toxicol.* 219, 105381. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105381>.
- Mommsen, T.P., 1984. 7 metabolism of the Fish Gill. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology, Gills*. Academic Press, pp. 203–238. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60186-7](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60186-7).
- Monteiro, L., Moens, T., Lynen, F., Traunspurger, W., 2019. Effects of the water-soluble fraction of a crude oil on freshwater meiofauna and nematode assemblages. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 176, 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.083>.
- Mu, R., Wang, Y.-B., Wu, M., Yang, Y., Song, W., Li, T., Zhang, W.-N., Tan, B., Li, A.-L., Wang, N., Xia, Q., Gong, W.-L., Wang, C.-G., Zhou, T., Guo, N., Sang, Z.-H., Li, H.-Y., 2014. Depletion of pre-mRNA splicing factor Cdc5L inhibits mitotic progression and triggers mitotic catastrophe. *Cell Death Dis.* 5, e1151. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.117>.
- Müller, Gdo A.E.S., Lückmann, K.H., Razzera, G., Toledo-Silva, G., Bebianno, M.J., Marques, M.R.F., Bainy, A.C.D., 2018. Proteomic response of gill microsomes of *Crassostrea brasiliana* exposed to diesel fuel water-accommodated fraction. *Aquat. Toxicol.* 201, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.06.001>.
- Nelson, D., Heuer, R.M., Cox, G.K., Stieglitz, J.D., Hoening, R., Mager, E.M., Benetti, D.D., Grosell, M., Crossley, D.A., 2016. Effects of crude oil on in situ cardiac function in

- young adult mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). *Aquat. Toxicol.* 180, 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.10.012>.
- Nelson, D., Stieglitz, J.D., Cox, G.K., Heuer, R.M., Benetti, D.D., Grosell, M., Crossley, D.A., 2017. Cardio-respiratory function during exercise in the cobia, *Rachycentron canadum*: the impact of crude oil exposure. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 201, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.08.006>.
- Nourse, C.R., Mattei, M.-G., Gunning, P., Byrne, J.A., 1998. Cloning of a third member of the D52 gene family indicates alternative coding sequence usage in D52-like transcripts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1443, 155–168. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(98\)00211-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(98)00211-5).
- Ogura, T., Wilkinson, A.J., 2001. AAA+ superfamily ATPases: common structure–diverse function. *Genes Cells* 6, 575–597.
- Pruell, R.J., Lake, J.L., Davis, W.R., Quinn, J.G., 1986. Uptake and depuration of organic contaminants by blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to environmentally contaminated sediment. *Mar. Biol.* 91, 497–507. <https://doi.org/10.1007/BF00392601>.
- Pyle, G., Ford, A.T., 2017. Behaviour revised: contaminant effects on aquatic animal behaviour. *Aquat. Toxicol.* 182, 226–228. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.11.008>.
- R Core Team, 2016. R: a Language and Environment for Statistical Computing. URL: R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Ramachandran, S.D., Sweezey, M.J., Hodson, P.V., Boudreau, M., Courtenay, S.C., Lee, K., King, T., Dixon, J.A., 2006. Influence of salinity and fish species on PAH uptake from dispersed crude oil. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 1182–1189. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.02.009>.
- Reissner, C., Runkel, F., Missler, M., 2013. Neurexins. *Genome Biology* 14, 213. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-9-213>.
- Rivière, G., Klopp, C., Ibouniyamine, N., Huvet, A., Boudry, P., Favrel, P., 2015. GigaTON: an extensive publicly searchable database providing a new reference transcriptome in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *BMC Bioinformatics* 16, 401. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0833-4>.
- Roberts, R.J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P., Sung, Y.Y., 2010. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *J. Fish Dis.* 33, 789–801. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01183.x>.
- Rossi, S.S., Thomas, W.H., 1981. Solubility behavior of three aromatic hydrocarbons in distilled water and natural seawater. *Environ. Sci. Technol.* 15, 715–716. <https://doi.org/10.1021/es00088a013>.
- Salazar-Coria, L., Rocha-Gómez, M.A., Matadamas-Martínez, F., Yépez-Mulia, L., Vega-López, A., 2019. Proteomic analysis of oxidized proteins in the brain and liver of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a water-accommodated fraction of Maya crude oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 171, 609–620. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.033>.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>.
- Shen, Y., Wen, Q., Liu, H., Zhong, C., Qin, Y., Harris, G., Kawano, T., Wu, M., Xu, T., Samuel, A.D., Zhang, Y., 2016. An extrasynaptic GABAergic signal modulates a pattern of forward movement in *Caenorhabditis elegans*. *eLife* 5, e14197. <https://doi.org/10.7554/eLife.14197>.
- Shrivastava, A., Gupta, V.B., 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chron. Young Sci.* 2, 21. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>.
- Shukla, P., Gopalani, M., Ramteke, D.S., Wate, S.R., 2007. Influence of salinity on PAH uptake from water soluble fraction of crude oil in *Tilapia mossambica*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 601–605. <https://doi.org/10.1007/s00128-007-9272-x>.
- Sies, H., 2017. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress. *Redox Biol.* 11, 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>.
- Stegeman, J.J., Teal, J.M., 1973. Accumulation, release and retention of petroleum hydrocarbons by the oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 22, 37–44. <https://doi.org/10.1007/BF00388908>.
- Sun, X., Liu, Z., Wu, B., Zhou, L., Wang, Q., Wu, W., Yang, A., 2018. Differences between fast and slow muscles in scallops revealed through proteomics and transcriptomics. *BMC Genomics* 19, 377. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4770-2>.
- Sysoeva, T.A., 2017. Assessing heterogeneity in oligomeric AAA+ machines. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 1001–1018. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2374-z>.
- Tanaka, H., Suzuki, H., Ohtsuki, I., Ojima, T., 2008. Structure-function relationships of molluscan troponin T revealed by limited proteolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 1037–1042. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.04.001>.
- Tomanek, L., 2015. Proteomic responses to environmentally induced oxidative stress. *J. Exp. Biol.* 218, 1867–1879. <https://doi.org/10.1242/jeb.116475>.
- 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. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 914–920. <https://doi.org/10.1002/etc.5620220432>.
- Tyanova, S., Cox, J., 2018. Perseus: A bioinformatics platform for integrative analysis of proteomics data in cancer research. In: von Stechow, L. (Ed.), *Cancer Systems Biology: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Springer, New York, New York, NY, pp. 133–148. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7493-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7493-1_7).
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., Mann, M., Cox, J., 2016. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote) omics data. *Nat. Methods* 13, 731–740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>.
- Van Aggelen, G., Ankley, G.T., Baldwin, W.S., Bearden, D.W., Benson, W.H., Chipman, J.K., Collette, T.W., Craft, J.A., Denslow, N.D., Embry, M.R., Falciani, F., George, S.G., Helbing, C.C., Hoekstra, P.F., Iguchi, T., Kagami, Y., Katsiadaki, I., Kille, P., Liu, L., Lord, P.G., McIntyre, T., O'Neill, A., Osachoff, H., Perkins, E.J., Santos, E.M., Skirrow, R.C., Snape, J.R., Tyler, C.R., Versteeg, D., Viant, M.R., Volz, D.C., Williams, T.D., Yu, L., 2010. Integrating omic technologies into aquatic ecological risk assessment and environmental monitoring: hurdles, achievements, and future outlook. *Environ. Health Perspect.* 118, 1–5. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900985>.
- van Haren, R.J.F., Schepers, H.E., Kooijman, S.A.L.M., 1994. Dynamic energy budgets affect kinetics of xenobiotics in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Chemosphere* 29, 163–189. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(94\)90099-X](https://doi.org/10.1016/0045-6535(94)90099-X).
- Walker, M.C., van der Donk, W.A., 2016. The many roles of glutamate in metabolism. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43, 419–430. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1665-y>.
- Walls, A.B., Waagepetersen, H.S., Bak, L.K., Schousboe, A., Sonnewald, U., 2015. The glutamine-glutamate/GABA cycle: function, regional differences in glutamate and GABA production and effects of interference with GABA metabolism. *Neurochem. Res.* 40, 402–409. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1473-1>.
- Webster, L., Russell, M., Packer, G., Moffat, C.F., 2006. Long term monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in blue mussels (*Mytilus edulis*) from a remote Scottish location. *Polycycl. Aromat.* 26, 283–298. <https://doi.org/10.1080/10406630600904109>.
- Won, E.-J., Kim, R.-O., Kang, H.-M., Kim, H.-S., Hwang, D.-S., Han, J., Lee, Y.H., Hwang, U.-K., Zhou, B., Lee, S.-J., Lee, J.-S., 2016. Adverse effects, expression of the Bk-CYP3045C1 gene, and activation of the ERK signaling pathway in the water accommodated fraction-exposed rotifer. *Environ. Sci. Technol.* 50, 6025–6035. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01306>.
- Wu, H., Wang, W.-X., 2010. NMR-based metabolomic studies on the toxicological effects of cadmium and copper on green mussels *Perna viridis*. *Aquat. Toxicol.* 100, 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.08.005>.
- Wu, W.-J., Qin, N., He, W., He, Q.-S., Ouyang, H.-L., Xu, F.-L., 2012. Levels, distribution, and health risks of polycyclic aromatic hydrocarbons in four freshwater edible fish species from the Beijing Market. *The Sci. World J.* 2012, 1–12. <https://doi.org/10.1100/2012/156378>.
- Wu, Y., Brosh, R.M., 2010. Distinct roles of RECQ1 in the maintenance of genomic stability. *DNA Repair (Amst.)* 9, 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.12.010>.
- Xu, F.-L., Wu, W.-J., Wang, J.-J., Qin, N., Wang, Y., He, Q.-S., He, W., Tao, S., 2011. Residual levels and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater fishes from Lake Small Bai-Yang-Dian, Northern China. *Ecol. Modell.* 222, 275–286. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2010.10.001>.
- Yamada, A., Yoshio, M., Oiwa, K., 2013. Myosin Mg-ATPase of molluscan muscle is slightly activated by F-actin under catch state in vitro. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 34, 115–123. <https://doi.org/10.1007/s10974-013-9339-8>.
- Zhang, Guofan, Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, Jiafeng, Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, Shoudi, Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Yingxiang, Li, Na, Wang, Jinpeng, Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, Hailong, Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, Shu, Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, Junyi, Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, Ning, Qian, L., Zhang, Guojie, Li, Yingrui, Wang, Zhang, Huanming, Liu, X., Wang, Jian, Yin, Y., Wang, Jun, 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490, 49–54. <https://doi.org/10.1038/nature11413>.
- Zhang, Yang, Sun, J., Mu, H., Li, J., Zhang, Yuehuan, Xu, F., Xiang, Z., Qian, P.-Y., Qiu, J.-W., Yu, Z., 2015. Proteomic basis of stress responses in the gills of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *J. Proteome Res.* 14, 304–317. <https://doi.org/10.1021/pr500940s>.
- Zot, A.S., Potter, J.D., 1987. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 16, 535–559. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.16.060187.002535>.

## **6.3 Analyse du protéome du ganglion viscéral de l'huitre *M. gigas***

### **6.3.1 Introduction**

Dans la partie précédente (§ 6.2), nous nous sommes attachés à tenter de mieux comprendre les perturbations du milieu intérieur des corbicules exposés au pétrole brut en conditions semi-naturelles. Nous avons réalisé des analyses de protéomique sur le pool muscles + ganglions nerveux et sur les branchies de corbicules exposés ou non au pétrole brut. Diverses informations d'intérêt ont été relatées ou attribuées à la perturbation de l'activité des cellules nerveuses des ganglions, et ce, à partir des résultats obtenus pour l'ensemble tissulaire muscles + ganglions. Pour des raisons techniques (ganglion très petit, trop long à disséquer), on ne pouvait pas aller plus loin chez le corbicule. Chez l'huitre par contre, il nous a été possible de dissocier spécifiquement le ganglion viscéral du tissu musculaire en un temps satisfaisant lors des dissections. Comme chez les corbicules, le système nerveux de l'huitre est décentralisé. Néanmoins, le ganglion viscéral de l'huitre est très développé et peut-être considéré comme l'élément majeur de son système nerveux (Sugawara, 1964 ; cf. Chapitre 2, § 3.4.1). Dans la partie qui vient, nous nous sommes donc attachés à étudier spécifiquement les perturbations du ganglion viscéral de l'huitre exposée au pétrole brut, durant 8 jours en conditions contrôlées de laboratoire (échantillonnées à P8, Fig. 5.3.1, flèche bleue), à travers une approche de protéomique similaire à celle utilisée chez les corbicules. Cette partie vient en complément du § 5.3 (Chapitre 5) où le comportement des huitres a été décrit en fonction des différentes concentrations de pétrole brut appliquées. Les analyses du protéome des ganglions viscéraux de 12 d'entre elles (6 huitres contrôles et 6 huitres exposées au pétrole brut) sont présentées ici.

### 6.3.2 Résultats

Un total de 5057 protéines a été identifié dans les ganglions viscéraux des huitres. Parmi elles, 4490 ont été conservées après traitement des données (le traitement des données est identique à celui réalisé dans Miserazzi et al., 2020b ; § 6.2.2). La différence d'abondance de 330 d'entre elles est significative entre huitres exposées ou non au pétrole brut (soit 7,4 % des 4490 protéines ; FDR < 0,2). L'analyse en composante principale (ACP) réalisée avec ces 330 protéines significatives (Fig. 6.2.1) montre une claire individualisation des huitres exposées et des huitres non exposées, en permettant l'explication de 71,1 % de la variabilité totale (Composant 1 (62,2 %) + Composant 2 (8,9 %)).

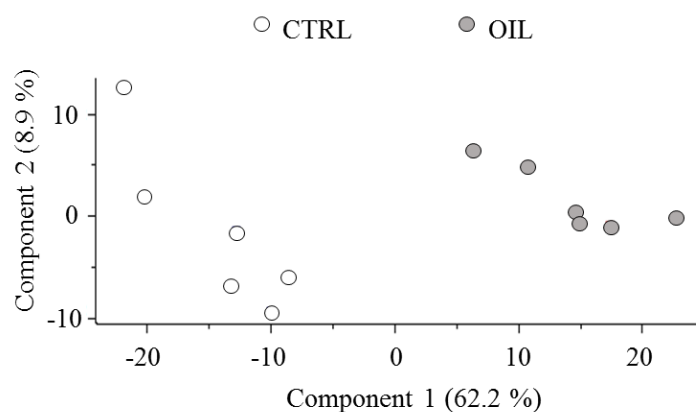


Figure. 6.2.1. Analyse en Composantes Principales (ACP) des protéines (FDR < 0,2) du ganglion viscéral des huitres. L'analyse sépare clairement les 6 huitres exposées au pétrole brut (OIL, cercles gris, à droite) et les 6 huitres contrôles (CTRL, cercles blancs, à gauche).

Cette ségrégation se retrouve de façon claire au niveau du clustering vertical de la heatmap (Fig. 6.2.2) avec d'un côté le regroupement des ganglions viscéraux des individus exposés (n = 6) et de l'autre le regroupement des non-exposés (n = 6). Le clustering horizontal laisse apparaître deux groupes : le premier (gris foncé), est caractérisé par 178 protéines dont l'abondance est moins importante chez les huitres exposées que chez les non exposées et le second (gris clair), est caractérisé par les 152 protéines dont l'abondance est plus importante.

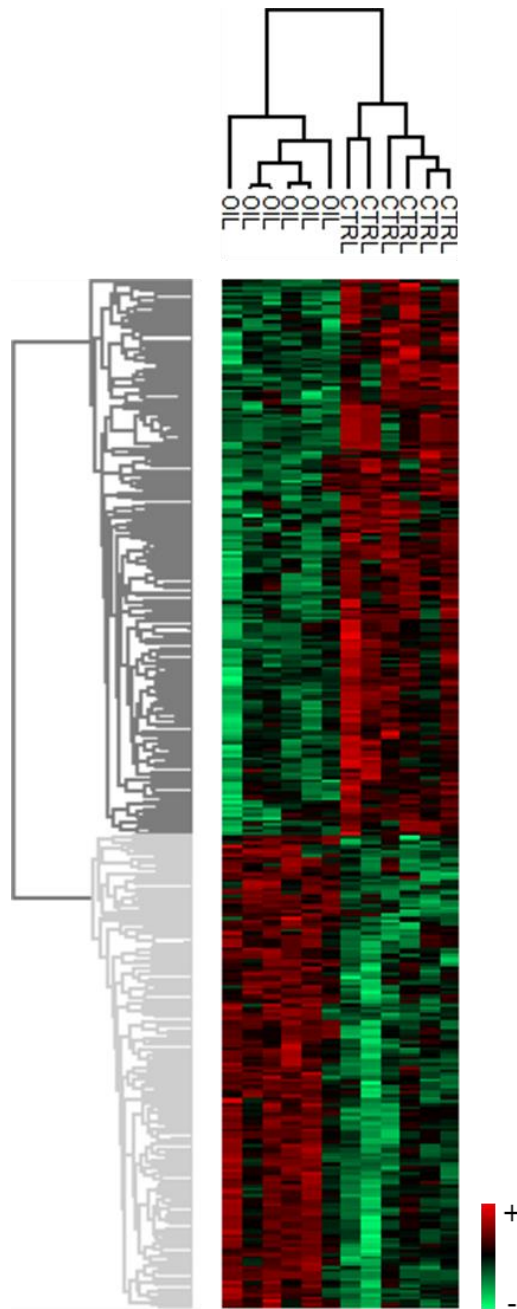


Figure. 6.2.2. Heatmap des protéines (FDR < 0,2) du ganglion viscéral des huitres. En rouge, les protéines dont l'abondance relative est plus importante chez les huitres exposées au pétrole brut et en vert, les protéines dont l'abondance relative est moins importante. Le clustering vertical sépare les 6 ganglions viscéraux des huitres exposées (OIL) des 6 ganglions viscéraux des huitres contrôles (CTRL). Le clustering horizontal sépare les protéines moins abondantes dans les ganglions viscéraux des huitres exposées (cluster gris foncé, n = 178 protéines) des protéines plus abondantes (cluster gris clair ; n = 152 protéines).

Les **protéines sous abondantes** dans le ganglion viscéral des huitres exposées au pétrole brut sont majoritairement impliquées dans des processus biologiques liés au métabolisme général, c'est-à-dire à l'ensemble des réactions d'anabolisme et de catabolisme permettant aux organismes de transformer les substances chimiques (en référence aux termes « metabolic process », « small molecule metabolic process », « oxidation-reduction process » et « ATP metabolic process » ; Fig 6.2.3A).

L'analyse des fonctions moléculaires (Fig. 6.2.4A) met en évidence la fonction « binding drug » qui traduit un effet sur les interactions des protéines avec une ou plusieurs substances (drogue, médicament), naturelle ou synthétique autre qu'un nutriment, en mesure d'affecter la structure ou le fonctionnement d'un organisme. L'analyse des fonctions moléculaires de cet ensemble de protéines (Fig. 6.2.4A) montre également que nombreuses d'entre elles présentent une activité catalytique (Fig. 6.2.4A ; « catalytic activity ») et sont autrement dit des enzymes. Ces enzymes, en plus de jouer un rôle dans les mécanismes de « binding drug », jouent un rôle dans la catalyse de réactions redox (Fig. 6.2.4A ; « oxidoreductase activity ») et/ou dans la catalyse d'autres réactions plus spécifiques (en référence aux termes « GTP cyclohydrolase I activity », « phosphotransferase activity alcohol group as acceptor », « xylulokinase activity », « kynureninase activity », « methylmalonyl-CoA mutase activity » ; Fig. 6.2.4A). La perturbation de l'activité de la xylulokinase peut être mise en parallèle de la perturbation de la voie biologique « Pentose and glucuronate interconversions » mise en évidence par l'analyse KEGG (Fig. 6.2.6A). Elle traduit une perturbation spécifique du métabolisme glucidique.

Enfin, on retrouve la perturbation de l'ATP synthase, pompe à protons à l'origine de la génération d'ATP, *via* les termes « proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism » (Fig. 6.2.4A) et « proton transporting two-sector ATPase complex, catalytic domain » (Fig. 6.2.5A). Ces niveaux d'analyse complètent la mise en évidence de la perturbation du processus biologique « ATP metabolic process » (Fig. 6.2.3A).

L'analyse des processus biologiques associés aux **protéines surabondantes** (Fig. 6.2.3B) met en évidence que nombreuses d'entre elles sont impliquées dans des réactions liées aux composés organiques azotés. Ces composés sont par exemple des amines, présentes dans les acides aminés ou dans divers neurotransmetteurs (Fig. 6.2.3B ; « organonitrogen compound metabolic process »).

L'analyse met également en évidence le processus biologique « regulation of microtubule polymerization or depolymerization » c'est-à-dire tout processus qui module la dynamique de la polymérisation - dépolymérisation des microtubules par l'addition ou l'élimination de dimères de tubuline (Fig. 6.2.3B). La perturbation du fonctionnement des fibres du cytosquelette se retrouve également dans l'analyse des fonctions moléculaires (Fig 6.2.4B ; « cytoskeletal adaptator activity »). Les analyses mettent aussi en évidence la perturbation du processus biologique d'acétylation des histones (en référence au terme « histone acetyltransferase activity » c'est-à-dire à la réaction :  $\text{acetyl-CoA} + \text{histone} = \text{CoA} + \text{acetyl-histone}$  ; Fig. 6.2.3B et 6.2.4B). Ce processus réversible est associé à l'activation du mécanisme de transcription. En complément de la perturbation de ce mécanisme, on note la perturbation d'une étape de la traduction (Fig 6.2.4B ; « aminoacyl-tRNA ligase activity »). L'analyse des composants cellulaires (Fig. 6.2.5B) met en évidence la perturbation de la membrane du réticulum endoplasmique, un organe aussi appelé corps de Nissl dans les neurones, qui participe à la synthèse protéique.

L'analyse des fonctions moléculaires (Fig. 6.2.4) montre la surabondance de protéines constitutives de la matrice extracellulaire (Fig. 6.2.4B ; « extracellular matrix structural constituent ») qui joue un rôle central au sein du système nerveux en participant notamment à la régulation de la plasticité synaptique. En complément, on retrouve dans l'analyse des composés cellulaires (Fig. 6.2.5), une famille de protéines structurelles constitutives de cette matrice (Fig 6.2.5B ; « collagen trimer »).

On retrouve également un nombre relativement important de protéines impliquées dans la régulation des fonctions moléculaires et dans l'activité de protéolyse (Fig. 6.2.4B ; « regulation of molecular functions » ; « peptidase activity »).

Enfin, l'analyse KEGG (Fig. 6.2.6B) met en évidence l'induction des voies biologiques du cancer ainsi que de la voie du « Transforming Growth Factor-beta » (TGF- $\beta$ ). Les protéines membres de cette famille sont impliquées dans un large spectre de fonctions telles que la prolifération, l'apoptose (mort cellulaire programmée), la différenciation et la migration cellulaire (Fig. 6.2.6B).

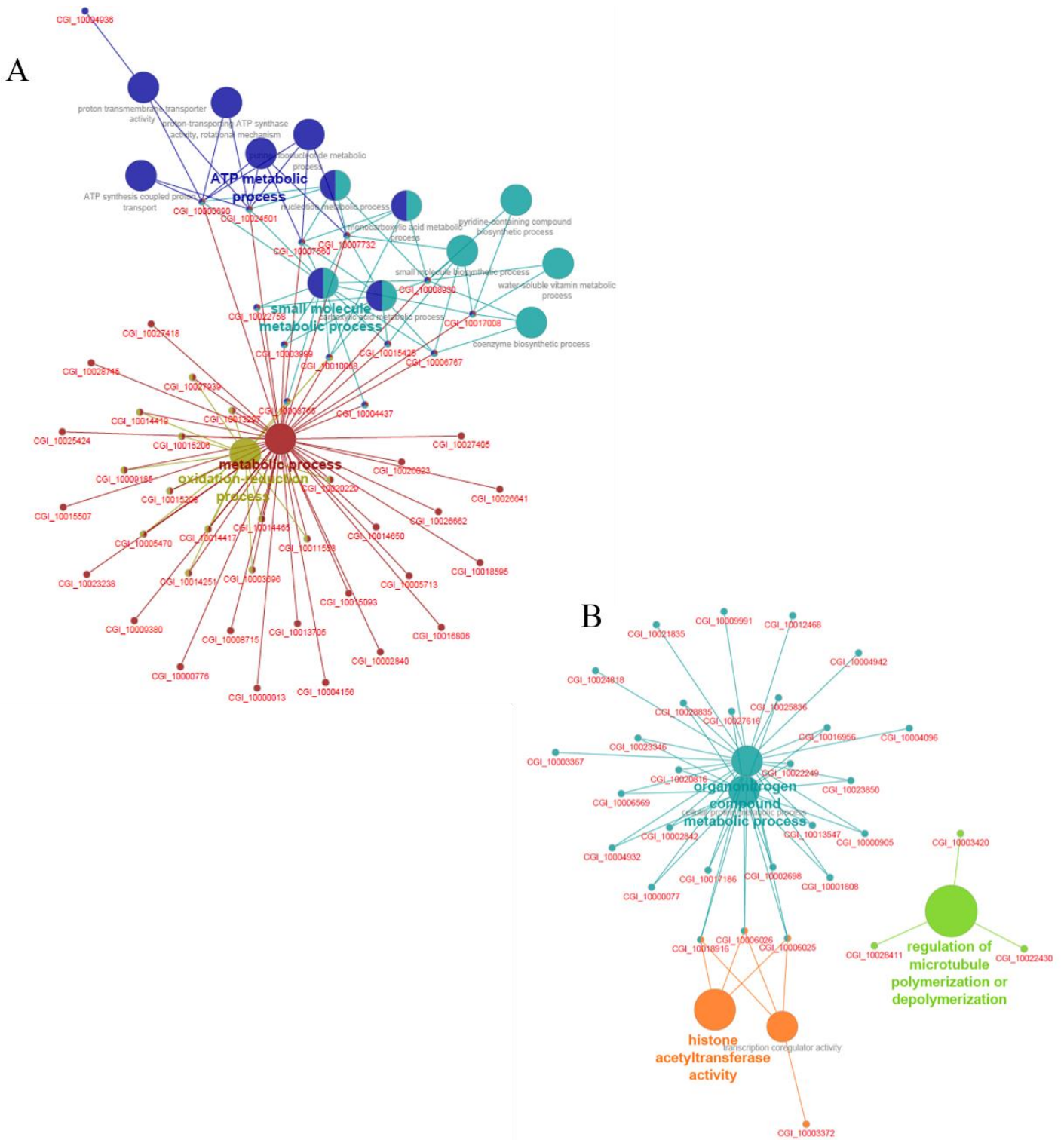


Figure. 6.2.3. Analyses d'enrichissement des protéines (FDR < 0,2) du ganglion viscéral des huîtres. Réseaux fonctionnels réalisés avec les données Biological Process de Gene Ontology (GOBP ; p < 0,05), pour (A) les protéines dont l'abondance est moins importante chez les huîtres exposées au pétrole brut et pour (B) les protéines dont l'abondance est plus importante chez les huîtres exposées.



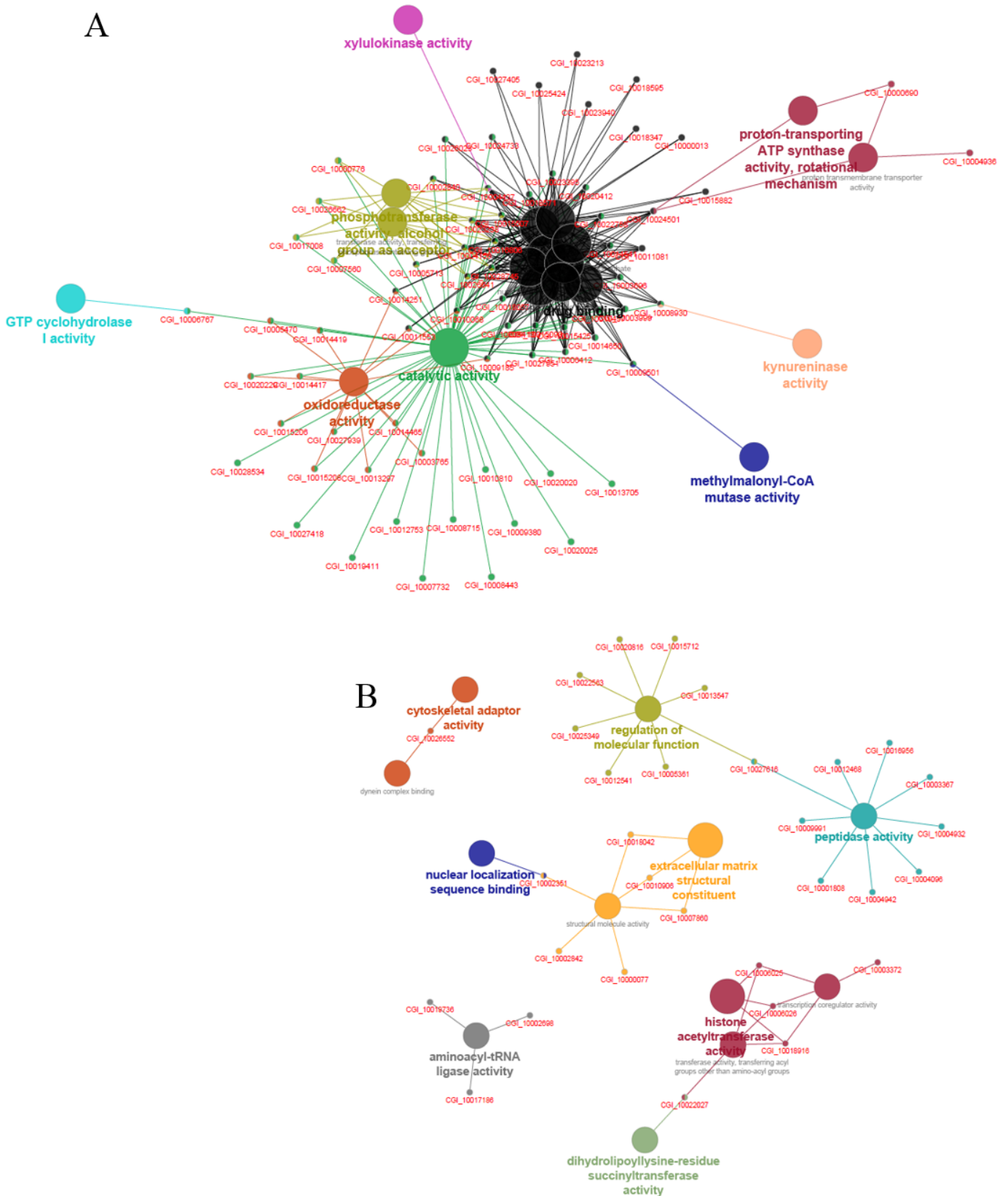


Figure. 6.2.4. Analyses d'enrichissement des protéines (FDR < 0,2) du ganglion viscéral des huitres. Réseaux fonctionnels réalisés avec les données Molecular Functions de Gene Ontology (GOMF ;  $p < 0,05$ ), pour (A) les protéines dont l'abondance est moins importante chez les huitres exposées au pétrole brut et pour (B) les protéines dont l'abondance est plus importante chez les huitres exposées.

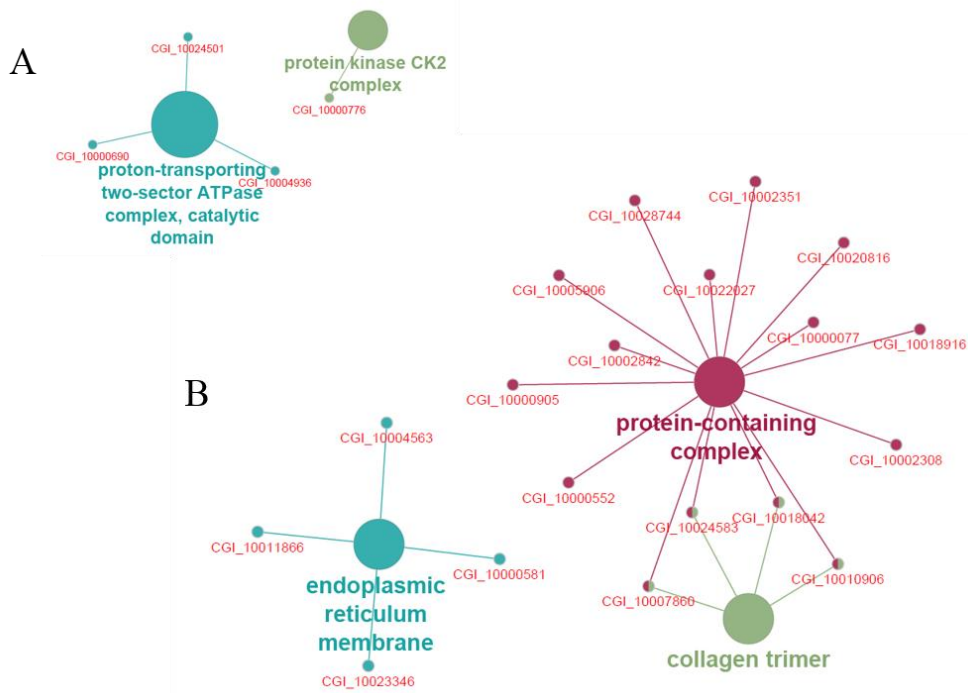


Figure. 6.2.5. Analyses d'enrichissement des protéines (FDR < 0,2) du ganglion viscéral des huitres. Réseaux fonctionnels réalisés avec les données Cellular Component de Gene Ontology (GOCC ;  $p < 0,05$ ), pour (A) les protéines dont l'abondance est moins importante chez les huitres exposées au pétrole brut et pour (B) les protéines dont l'abondance est plus importante chez les huitres exposées.

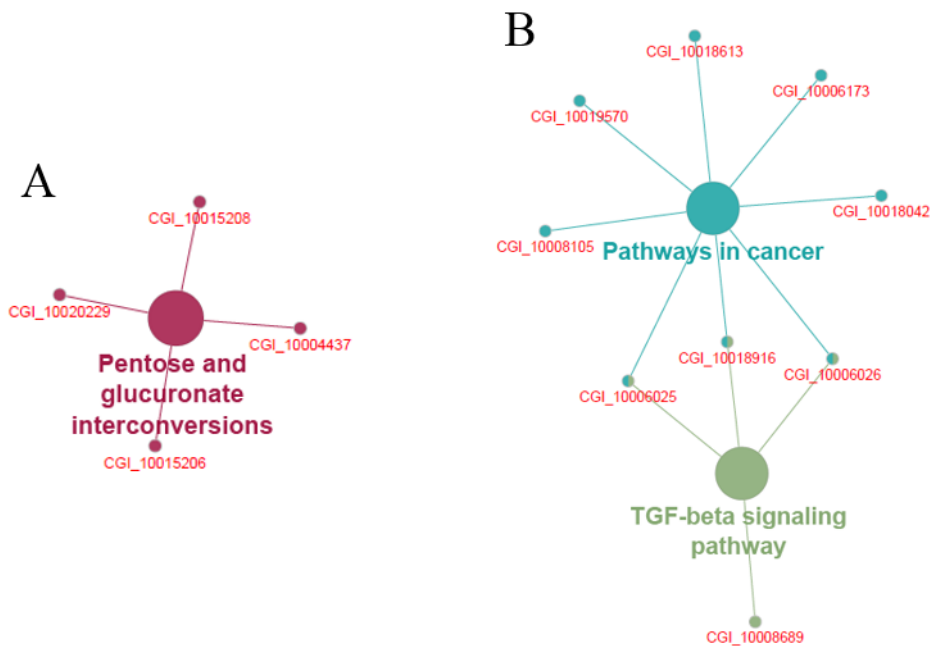


Figure. 6.2.6. Analyses d'enrichissement des protéines (FDR < 0,2) du ganglion viscéral des huitres. Réseaux fonctionnels réalisés avec les données KEGG Pathway ( $pV < 0,05$ ), pour (A) les protéines dont l'abondance est moins importante chez les huitres exposées au pétrole brut et pour (B) les protéines dont l'abondance est plus importante chez les huitres exposées.

### 6.3.3 Discussion

Les analyses en réseaux représentant les protéines sous abondantes dans les ganglions viscéraux des huitres exposées au pétrole brut font apparaître la perturbation du métabolisme de l'ATP (adénosine triphosphate). L'ATP est synthétisé au sein des mitochondries par l'ATP synthase lors de l'étape finale de la chaîne de transport des électrons. D'après les analyses, la perturbation de ce processus serait ici en lien avec la perturbation du mécanisme rotationnel des sous-unités de l'ATP synthase insérées dans la bicouche lipidique de la membrane mitochondriale interne (Elston et al., 1998 ; Stock et al., 1999). L'ATP possède de multiples fonctions intracellulaires bien référencées. En tant que ressource énergétique universelle, il soutient la réalisation des réactions chimiques du métabolisme, le transport actif ou encore la génération du mouvement. L'ATP agit également en tant que donneur de groupement phosphate et en tant que précurseur d'un certain nombre de cofacteurs enzymatiques. L'ATP posséderait également des fonctions de signalisation intercellulaire, et est, à ce titre, considéré comme neurotransmetteur du système nerveux (Burnstock, 2006 ; Zimmermann, 2008).

L'ensemble des protéines sous abondantes est également caractérisé par d'autres processus biologiques liés au métabolisme au sens large, au métabolisme des glucides ou par la présence de nombreuses protéines exerçant des activités enzymatiques. On observerait donc une chute de l'activité des cellules nerveuses du ganglion viscéral des huitres exposées au pétrole. Ces perturbations paraissent en cohérence avec un des modes de toxicité du pétrole, la narcose. La narcose consiste en une perturbation réversible et non spécifique du fonctionnement des membranes biologiques du fait de l'accumulation de composés hydrophobes dans ces bicouches lipidiques. Cela entraîne une diminution globale de l'activité des cellules et, *in fine*, des organismes (van Wezel and Opperhuizen, 1995). C'est une forme d'anesthésie.

L'analyse des protéines surabondantes dans les ganglions viscéraux des huitres exposées au pétrole brut montre également des protéines impliquées dans quelques processus métaboliques spécifiques. On observerait donc un remaniement global des processus métaboliques bien que la chute de l'activité apparaisse tout de même comme la variation majeure. D'après Anderson et al. (2015), qui ont réalisé une méta-analyse de la littérature

concernant les effets de plusieurs stress environnementaux sur l'expression des gènes de l'huitre (études réalisées sur : glande digestive, branchies, hépatopancréas, manteau, gonade, l'hémolymphe), la dérégulation générale des processus métaboliques fait partie de l'ensemble de base perturbé en présence d'un stress.

L'analyse des protéines surabondantes dans les ganglions viscéraux des huitres exposées au pétrole traduit également une perturbation de l'activité des microtubules et de l'activité d'une famille de protéines motrices des microtubules, les dynéines. En cohérence avec ces résultats, Salazar-Coria et al. (2019), ont mis en évidence la perturbation du remodelage des microtubules dans le tissu cérébral du poisson *Oreochromis niloticus* exposé à un pétrole brut. Les microtubules sont des constituants du cytosquelette très présents dans les neurones où ils jouent notamment un rôle fondamental dans le transport axonal (Sleigh et al., 2019 ; Yogev et al., 2016). Le transport axonal est le processus par lequel le matériel cellulaire transite d'une extrémité à l'autre du neurone. On parle de transport antérograde lors du transport allant du corps cellulaire vers l'extrémité de l'axone et du transport rétrograde dans l'autre sens (Millecamps et Julien, 2008). Ces différents types de transport sont rendus possibles, d'une part grâce aux filaments du cytosquelette, qui servent de voies de communication et, d'autre part grâce aux protéines motrices, qui utilisent l'ATP pour faire transiter le matériel cellulaire le long des fibres du cytosquelette. Parmi elles, les dynéines sont spécifiques du transport rétrograde dont le rôle est de faire transiter des facteurs de croissance ou des vésicules de dégradation contenant des agrégats de protéines et/ou des organites âgés (Guedes-Dias et Holzbaur, 2019). Les processus de transport axonal sont considérés comme essentiels pour le fonctionnement, le développement et la survie neuronale, mais l'importance de leur implication dans diverses pathologies du système nerveux est encore souvent débattue (Sleigh et al., 2019).

Enfin, l'analyse des protéines surabondantes dans les ganglions viscéraux des huitres exposées au pétrole traduit également une perturbation des constituants de la matrice extracellulaire (MEC). La MEC est un assemblage de macromolécules (collagènes, protéoglycanes, et glycoprotéines notamment) qui lie les cellules entre elles et détermine l'architecture des tissus. Les molécules de la MEC, en plus d'interagir entre elles, permettent de coordonner des fonctions cellulaires telles que la prolifération, la migration ou la différenciation à travers divers récepteurs cellulaires de surface. Dans le système nerveux,

la MEC coordonne aussi la synaptogenèse et la plasticité synaptique (c'est-à-dire la capacité des synapses à faire varier l'efficacité de leur transmission ; Dityatev et al., 2010 ; Dityatev et Schachner, 2003).

Étonnement, l'ensemble des protéines significativement sous abondantes est caractérisé par la fonction « binding drug » qui pourrait être liée à la chute générale de l'activité cellulaire (narcose) et pourrait avoir un effet particulièrement néfaste dans le cas de la contamination du ganglion viscéral. En parallèle, l'analyse des protéines classiquement impliquées (ou suspectées d'être impliquée) dans les processus de biotransformation met en évidence la sous abondance du cytochrome P450 3A24 (FC, 0.3 ; FDR, 0.16). Suite à l'exposition de l'huitre *M. gigas* au pétrole brut, Lopez-Landavery et al. (2019) avaient rapporté l'augmentation de l'expression du gène de ce cytochrome P450 3A24 dans la glande digestive. La surexpression du gène CYP3 a également été rapportée dans d'autres études suite à l'exposition de mollusques bivalves ou invertébrés au pétrole brut ou à des HAP (Ertl et al., 2016 ; Rewitz et al., 2004 ; Piazza et al., 2016). L'analyse des protéines met également en évidence la sous abondance de la protéine MDR1 (Multidrug resistance protein 1 ; FC, 0.1 ; FDR, 0.05). Cette protéine, qui appartient à la super famille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette), est une pompe d'efflux transmembranaire qui permet le transport actif de composés endogènes ou exogènes hors des cellules (Brinkmann et Eichelbaum, 2001 ; Hoffmann et Kroemer, 2004). En ce qui concerne le système nerveux, son importance dans les mécanismes de détoxification du cerveau a été initialement mise en évidence chez la souris génétiquement déficiente pour cette protéine (Schinkel et al., 1994). Les protéines MDR1 permettent de réguler l'exposition des tissus cérébraux à diverses drogues, agents thérapeutiques, contaminants ou tout composés relativement lipophiles en capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique (Golden et Pollack, 2003). Les transporteurs ABC, et notamment la protéine MDR1, sont donc considérés comme des facteurs clés régissant l'homéostasie du tissu cérébral et permettant sa protection (Mahringer et Fricke, 2016). Chez l'huitre exposée au pétrole brut, la sous-abondance marquée de la protéine MDR1 pourrait donc exacerber l'effet d'une potentielle contamination des cellules nerveuses du ganglion viscéral par des composés hydrocarbonés. L'induction d'une protéine cousine, la MXR, avait été mise en évidence dans les branchies de corbicules lors d'une contamination par le cadmium (Legeay et al., 2005) et l'uranium (Tran et al., 2005).

Par ailleurs, l'analyse détaillée des protéines met également en évidence la perturbation de deux enzymes de défense contre des espèces réactives de l'oxygène (ROS). La superoxyde dismutase Cu/Zn (FC, 4.6 ; FDR, 0.19) qui catalyse la réaction de transformation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène en dehors de la matrice mitochondriale ; la glutathione peroxydase (FC, 0.7 ; FDR, 0.20) qui catalyse la réaction de transformation du peroxyde d'hydrogène en eau dans la matrice mitochondriale. L'abondance respective de ces deux enzymes suggère un excès de peroxyde d'hydrogène, un métabolite clé du stress oxydant en mesure de traverser les membranes biologiques, d'affecter d'autres molécules (lipides, protéines, ADN) à proximité ou à distance de son site d'origine et d'interférer avec l'ensemble des réactions biochimiques (Tomanek, 2015). Suite à une exposition au pétrole brut, différentes études de la littérature font également état de la perturbation d'enzymes impliquées dans la défense contre le stress oxydant chez les bivalves (Baussant et al., 2009 ; Boutet et al., 2004 ; Jiang et al., 2017 ; López-Landavery et al., 2019) ou de la perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le cerveau de poisson (Salazar-Coria et al., 2019). Précédemment (§ 6.2), nous avons relaté la perturbation de ces deux mêmes enzymes dans le pool tissulaire muscles + ganglions nerveux des corbicules exposés au pétrole brut. Avec l'ensemble des travaux fait chez le corbicule et l'huitre, il paraît donc plausible que ces deux enzymes soient impactées dans la fraction nerveuse du pool de tissus analysé chez les corbicules.

Enfin, l'analyse des protéines en surabondance met en évidence l'induction du processus de cancérogénèse. L'observation est cohérente avec la toxicité des composés pétroliers, tels que certains HAP qui sont des cancérigènes avérés (Guengerich, 2000 ; IARC, 2010). Le cancer est caractérisé par un spectre de nombreuses modifications typiques et divers processus sous-jacents (Hanahan et Weinberg, 2011). Parmi eux, on retrouve le remaniement du métabolisme, qui n'est pas uniquement la conséquence de la cancérogénèse mais qui fait partie des modifications qui peuvent la soutenir ou la stimuler (Hanahan et Weinberg, 2011 ; Lunt et Fendt, 2018 ; Rinaldi et al., 2017). La modification de l'activité transcriptionnelle fait aussi partie des changements métaboliques majeurs considérés comme moteurs de l'initiation tumorale (Lunt et Fendt, 2018 ; Rinaldi et al., 2017). Or, ce processus apparaît comme stimulé dans nos analyses au travers de la perturbation spécifique du processus biologique d'acétylation des histones permettant l'activation de la transcription de l'ADN.

### 6.3.4 Conclusion

À travers cette étude, nous avons donc mis en évidence la perturbation de différents processus biologiques dans le ganglion viscéral de l'huitre exposée au pétrole brut en conditions de laboratoire. Brièvement, les analyses traduisent une chute majeure des processus métaboliques, incluant une chute du métabolisme énergétique qu'il est cohérent de mettre en parallèle avec le mode de toxicité narcotique de certains composés hydrocarbonés du pétrole. Plus largement, les analyses traduisent une dérégulation générale du métabolisme. Ce remaniement métabolique, que l'on peut considérer comme une perturbation classique ou « de base » face à un stress, est également une caractéristique du processus de cancérogenèse notamment lorsqu'il implique l'activité transcriptionnelle des cellules. On a aussi mis en évidence un effet spécifique sur le transport axonal et la matrice extracellulaire « cérébrale ». Finalement on note la perturbation d'enzymes de lutte contre le stress oxydant qui suggère un excès de peroxyde d'hydrogène dans la cellule et une diminution des capacités de prise en charge de « drogues » qui pourraient conduire à l'exacerbation des effets d'une probable contamination. Au bilan, le ganglion viscéral (le « cerveau » de l'huitre) apparaît donc très touché par l'exposition que nous avons réalisée en laboratoire. Cela pourrait suggérer des capacités de défense limitées, voire dépassées, dans nos conditions expérimentales.

## 6.4 Conclusions du chapitre

Les travaux présentés dans ce chapitre ont permis de mieux appréhender et comprendre les perturbations du milieu intérieur sous-jacentes aux modifications comportementales chez deux espèces de mollusques bivalves exposés au pétrole brut. Le but est, *in fine*, de pouvoir comprendre le type de modification du milieu intérieur lorsque seul le comportement est analysé en ligne et à distance avec la Valvométrie HFNI.

Pour ce faire des analyses de protéomique différentielle, entre animaux exposés et non exposés au pétrole brut, ont été utilisées. Ce type d'analyse nous a permis d'aborder la problématique de manière globale et sans *a priori*. Les analyses ont été réalisées sur les branchies et sur le pool muscles + ganglions nerveux des corbicules exposés pendant 3 jours au pétrole brut en conditions semi-naturelles (concentration nominale constante,  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; concentration mesurée,  $\approx 170 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). La dénomination muscles + ganglions est utilisée ici pour décrire l'ensemble des muscles adducteurs (qui sont chacun un mélange de muscles striés et lisses), des muscles rétracteurs pédieux, du ganglion cérébral, du ganglion viscéral et de leurs innervations vers les muscles. Chez l'huitre, les analyses de protéomique ont été réalisées sur le ganglion viscéral uniquement. Tout comme celui des corbicules ou d'autres bivalves, le système nerveux de l'huitre est décentralisé. Néanmoins, le ganglion viscéral de l'huitre est très développé et est considéré comme l'élément majeur de son système nerveux, comme son « cerveau » (cf. Chapitre 3 ; § 3.4.1). Les huitres ont été exposées au pétrole brut en conditions de laboratoire pendant 8 jours (concentrations nominales variables comprises entre 390 et  $2800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Dans les différentes situations étudiées, les résultats des analyses de protéomique ont été essentiellement discutés sous deux aspects principaux : (i) les effets d'ordre toxicologique et (ii) les variations d'activité de grands processus biologiques.

Dans l'ensemble muscles + ganglions des corbicules, nous avons relaté un impact toxicologique relativement faible ainsi qu'une chute majeure de l'activité de processus métaboliques et cellulaires. Nous avons également montré la perturbation de l'activité nerveuse. Dans les branchies des corbicules, nous avons montré un impact toxicologique relativement plus important que dans les muscles + ganglions des corbicules avec en parallèle une augmentation de l'activité métabolique et cellulaire. Dans le ganglion viscéral



des huitres, nous avons plutôt observé un remaniement général des processus métaboliques et cellulaires bien que la diminution de leurs activités semble tout de même être la variation majeure. Nous avons également montré un impact toxicologique important, nettement supérieur à celui décrit chez les corbicules.

En comparant l'ensemble de ces résultats quel que soit le tissu étudié, nous avons observé une gradation de l'impact toxicologique en fonction de la contamination tissulaire chez les corbicules (seules les branchies sont significativement contaminées) ainsi qu'en fonction des concentrations et durées d'exposition des organismes (corbicules exposés 3 jours, concentration nominale de  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ; huitres exposées 8 jours, concentrations nominales de 390 à  $2800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Chez les corbicules, les changements protéomiques nous ont permis de proposer un ensemble de mécanismes explicatifs pour associer le comportement aux changements sous-jacents lors de l'exposition au pétrole brut. Nous avons notamment mis en relation la chute de l'activité métabolique, cellulaire et nerveuse du pool muscles + ganglions nerveux avec la diminution de l'activité valvaire. Les analyses réalisées sur le ganglion viscéral de l'huitre nous ont permis de confirmer la perturbation du tissu nerveux des bivalves en présence de pétrole brut. Par ailleurs, les analyses réalisées appuient également le fait que le ganglion viscéral de l'huitre est un tissu accessible et d'intérêt dans la cadre des études environnementales.

Au vu de l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent, et de l'effet de gradient relaté, nous avons posé la question des répercussions que pourrait avoir une exposition massive mais toujours écologiquement réaliste chez l'huitre, tant au niveau du comportement qu'au niveau des perturbations du ganglion viscéral. Ces deux points ont été développés dans le chapitre suivant (Chapitre 7).

# CHAPITRE 7

COMPORTEMENT,  
CONTAMINATION ET ANALYSE DU  
PROTEOME DE L'HUITRE EXPOSEE  
A UNE CONCENTRATION MASSIVE  
DE PETROLE BRUT



## 7.1 Introduction

En ce qui concerne les réponses comportementales des corbicules et des huitres décrites dans le Chapitre 5, nous avons émis l'hypothèse de l'existence possible d'un *continuum* du comportement en fonction des concentrations nominales d'exposition au pétrole brut. Dans le Chapitre 6, où nous avons relaté différentes perturbations physiologiques et cellulaires, nous avons posé la question des répercussions d'une exposition massive au pétrole brut. L'expérimentation qui nous a permis de préciser ces différents points soulevés (expérimentation de laboratoire n° 3 décrite dans le Chapitre 2, § 3.2.2) n'était pas prévue et résulte d'une erreur de calcul dans la phase préparatoire. Les observations réalisées au cours de cette expérience sont cependant totalement originales et nous ont permis d'élargir notre compréhension de la réponse des huitres au pétrole brut à des concentrations extrêmes mais réalistes. Au cours de la première heure d'exposition, les huitres ont été exposées à des concentrations nominales de pétrole brut ayant graduellement atteint la concentration de 60 mg·L<sup>-1</sup>. Ces valeurs sont de l'ordre de grandeur de celles autorisées dans les rejets d'eaux de production, un sous-produit issu de l'extraction du pétrole et du gaz. La plupart des agences de réglementation des pays avec une production de pétrole et de gaz offshore imposent des limites de concentrations en hydrocarbures pétroliers totaux dans les eaux de production rejetées (Chapitre 2, Tab. 2.1). Ces valeurs sont par exemple, de 30 mg·L<sup>-1</sup> (moyenne mensuelle autorisée) au Canada avec des maximums journaliers autorisés de 60 mg·L<sup>-1</sup> ; de 29 mg·L<sup>-1</sup> (moyenne mensuelle autorisée) aux USA avec des maximums journaliers autorisés de 42 mg·L<sup>-1</sup> ; de 40 mg·L<sup>-1</sup> (moyenne mensuelle autorisée) en mer méditerranée avec des maximums journaliers autorisés de 100 mg·L<sup>-1</sup> ou encore de 40 mg·L<sup>-1</sup> (moyenne mensuelle autorisée) au Nigeria avec des maximums journaliers autorisés de 72 mg·L<sup>-1</sup> (Lusinier et al., 2019 ; Neff, 2011 ; Veil, 2006 ; Zheng et al., 2016). Notons cependant que ces concentrations sont celles dans le rejet et sont indépendantes de la question de la dilution dans le milieu. Au cours de notre expérimentation, l'exposition des huitres a été maintenue sur une durée d'un peu moins de 2 jours et les concentrations nominales atteintes ont théoriquement été de l'ordre de 400 mg·L<sup>-1</sup> de pétrole brut. Une mortalité massive a été recensée chez les huitres à l'issue de cette exposition (entre 50 et 85 % suivant les unités expérimentales) mais des prélèvements pour différentes analyses ultérieures (dosage de HAP, analyse du protéome) ont tout de même été réalisés chez les huitres survivantes. Aucune mortalité n'a été observée en conditions contrôles.

## 7.2 Résultats et discussion

### 7.2.1 Cinétique de contamination

Durant la première heure d'exposition, la cinétique de contamination des unités expérimentales (Fig. 7.1) a pu être calculée car l'ensemble des paramètres régissant la contamination étaient connus avec précision et étaient maîtrisés (volume de l'ajout unique de pétrole brut dans la nourrice, volume de la nourrice et des UE, débit et concentration de l'eau entrante et sortante de la nourrice et des UE). Au bout d'une heure de contamination, la concentration dans les UE était théoriquement de  $59,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Fig. 7.1). Les calculs concernant cette cinétique de contamination n'ont cependant pas pu être réalisés de façon fiable pour la suite de l'expérimentation du fait de la variation de nombreux paramètres liés à l'allumage de la pompe péristaltique amenant le pétrole dans la nourrice et à la difficulté de contenir l'instabilité de l'ensemble des débits (liés notamment à l'incompatibilité pétrole / plastique / pompe à galets dans nos conditions expérimentales). Les concentrations ont néanmoins dû augmenter progressivement dans les UE et atteindre des valeurs de l'ordre de  $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  entre environ 3 et 13,5 h à l'issue du lancement de la contamination (constante de rinçage des UE,  $1\tau = 3 \text{ h}$  et  $4,5\tau = 13,5 \text{ h}$ ).

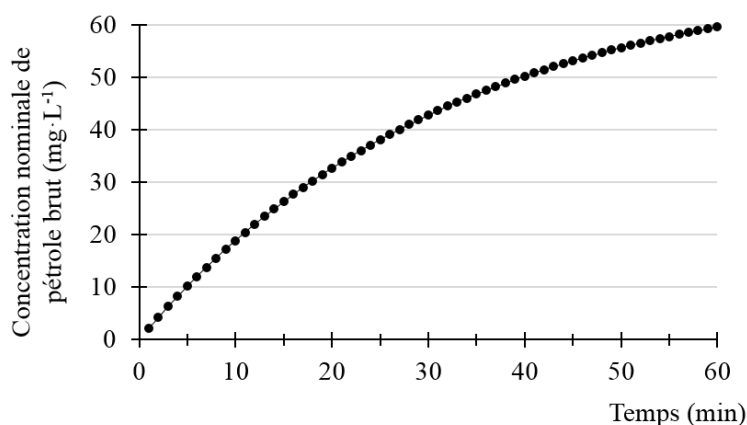


Figure 7.1. Cinétique de contamination théorique par le pétrole brut des unités expérimentales (UE) contenant les huitres durant la première heure d'exposition.

## 7.2.2 Réponse comportementale des huitres

Les Figures 7.2 et 7.3 sont des exemples typiques de la réponse comportementale de l’huitre exposée au pétrole brut dans ces conditions expérimentales à l’échelle de la journée (Fig. 7.2) et à l’échelle de l’heure (Fig. 7.3). Face à ces concentrations de pétrole brut, les huitres ont réagi par une bouffée extrême et transitoire, caractérisée par une très forte amplitude d’ouverture et par une très forte agitation des valves. L’amplitude d’ouverture de cette bouffée est doublée par rapport à l’amplitude des valves qui précède la contamination et l’agitation des valves est au moins 50 fois plus importante. Cette hyperactivité, au lieu de protéger l’animal de la contamination, devrait tendre à favoriser l’équilibration de son milieu intérieur avec le milieu extérieur contaminé. Ce comportement caractéristique a été retrouvé en condition multistress (présence additionnelle d’hypoxie et de pollution sonore, résultats non montrés). Par ailleurs, depuis maintenant une vingtaine d’années d’enregistrement du comportement avec la Valvométrie HFNI au laboratoire et sur le terrain et des milliers d’heures analysées, un tel comportement n’avait jamais été relaté (Massabuau, observation personnelle). C’est clairement le signe d’un événement extrême pour ces animaux.

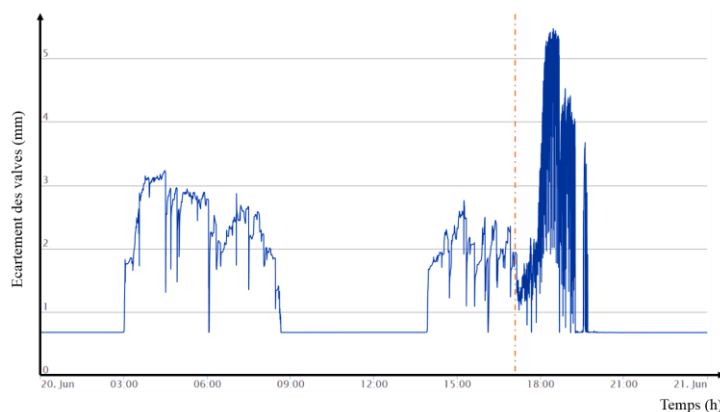


Figure 7.2. Enregistrement sur une période de 24 h du comportement valvaire de l’huitre avant et à partir de l’exposition au pétrole brut (à partir de la ligne orange en pointillé).

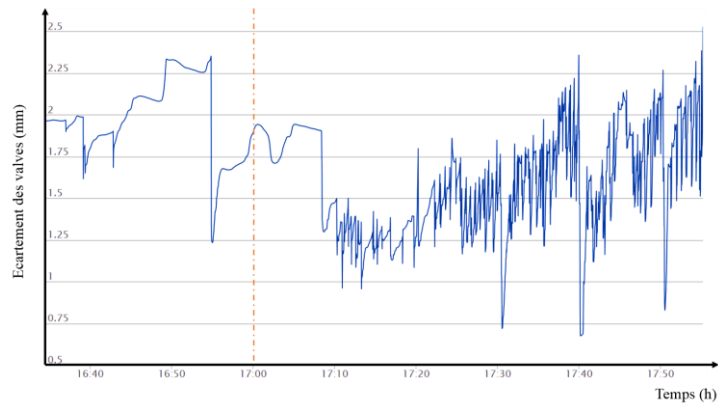


Figure 7.3. Enregistrement de la première phase de réponse de l’huitre face à la contamination par le pétrole brut. La contamination débute à partir de la ligne orange en pointillé. A 10 min d’exposition, (17 h 10 sur la figure), la concentration est théoriquement de  $\approx 19 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Les premières minutes de la réponse sont présentées sur la Figure 7.3. Sur ce tracé, il peut être mis en évidence que la réponse de l’huitre (augmentation de l’agitation des valves) apparait 10 min après le lancement de la contamination. A cet instant, la concentration de pétrole brut dans l’eau est théoriquement de  $19 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . La Figure 7.4 montre les délais moyens de réponse des huitres dans les 3 conditions expérimentales étudiées, pétrole seul (O), pétrole + hypoxie (OH) et pétrole + pollution sonore (ON). A ces délais moyens de réponse correspond une concentration théorique de pétrole brut comprise entre 28 et  $43 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Fig. 7.1). Ces données doivent être considérées dans le contexte particulier de cette expérience et ne doivent en aucun cas être utilisées comme seuil de sensibilité.

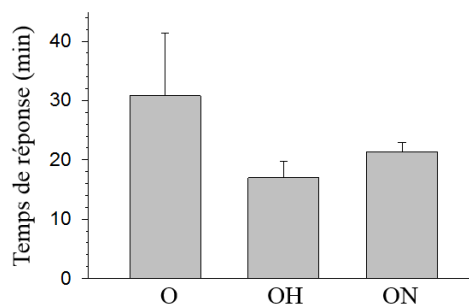


Figure 7.4. Temps de réponse (moyenne  $\pm 1$  SE, exprimé en min) de l’huitre suite à l’exposition au pétrole brut seul ou en conditions multistress (O, pétrole seul ; OH, pétrole + hypoxie ; ON, pétrole + pollution sonore).

La Figure 7.5 présente les deux exemples comportementaux caractéristiques faisant suite à la bouffée présentée sur le Figure 7.2. Ces deux exemples se soldent par la mort des individus, identifiée par une large et progressive béance des valves. Sur la Figure 7.5A, la bouffée relativement longue et de très forte amplitude (flèche orange) est suivie par la mort rapide de l'individu (flèche jaune), sans période de fermeture complète et prolongée des valves. A l'inverse sur la Figure 7.5B, la bouffée de l'huitre, relativement plus courte et d'amplitude moindre (flèche orange) ne conduit pas directement à la mort de l'individu (flèche jaune) mais est suivie d'une longue période de fermeture des valves entrecoupée par de brèves ouvertures (Fig. 7.5B, flèches bleues). À la fin des 44 h d'exposition au pétrole brut, la mortalité était comprise entre 50 et 85 % en fonction des UE.

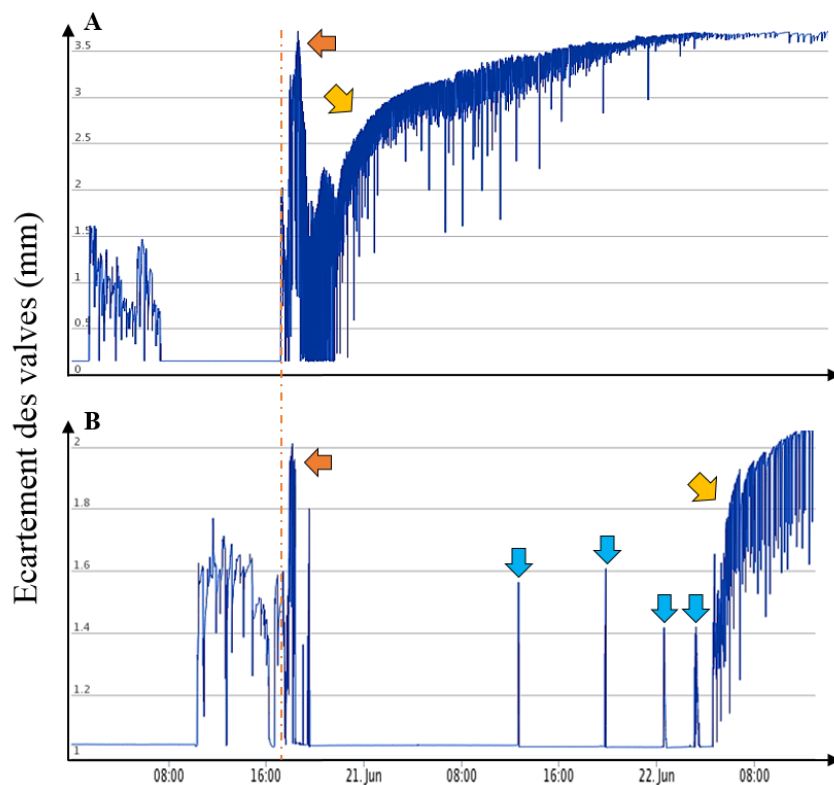


Figure 7.5. Exemples typiques de l'activité valvaire de deux huitres avant et durant la contamination par le pétrole brut se soldant dans les deux cas par la mort de l'individu. La contamination débute à partir de la ligne orange en pointillé. Les flèches orange pointent sur la bouffée initiale d'hyperactivité et hyperventilation. Les flèches jaunes pointent la béance progressive des valves témoignant de la mort de l'huitre. Les flèches bleues pointent vers les brèves ouvertures des valves.



### 7.2.3 Contamination des huitres

Des dosages de HAP dans les tissus des huitres survivantes ont été réalisés à la fin de la période d'exposition (au pétrole brut seul uniquement) de 44 h. Notons que les huitres vivantes à la fin de l'expérimentation sont celles dont le comportement est semblable à celui de l'huitre de la Figure 7.5B avant sa mort. Les phases de contamination des huitres sont donc représentées par la phase extrême et transitoire de la bouffée ainsi que par les brèves ouvertures des valves entrecoupant leurs larges périodes de fermeture. Dans les branchies, la concentration médiane en HAP chez les individus contrôles (non directement exposés au pétrole brut) est de  $80,5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (ww). Notons que cette valeur est du même ordre de grandeur que celles mesurées dans les branchies des corbicules exposés 10 jours au pétrole brut à une concentration nominale de pétrole brut de  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dans les rivières artificielles (Chapitre 6, § 6.2). La concentration médiane est de  $6906,4 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (ww) dans les branchies des huitres directement exposées (Fig. 7.1). Dans les muscles lisses, la concentration médiane est de  $900,4 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (ww) chez les individus contrôles et de  $2346,4 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (ww) chez les individus exposés. Dans les muscles striés, la concentration médiane est de  $595,6 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (ww) chez les individus contrôles et de  $2684,6 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (ww) chez les individus exposés. Que cela soit chez les individus contrôles ou les individus directement exposés, les concentrations mesurées témoignent d'une contamination. Pour les huitres directement exposées au pétrole brut, les concentrations tissulaires sont de l'ordre de 50 à 150 fois plus élevées que les concentrations mesurées de façon routinière dans les huitres entières du bassin d'Arcachon (Auby et al., 2013 par exemple). Ces données permettent également de confirmer la contamination marquée de l'environnement proche du ganglion viscéral de l'huitre (le ganglion viscéral est contre le sillon latéral situé entre le muscle strié et le muscle lisse ; cf. Chapitre 3, Fig. 3.9), que cela soit chez les individus contrôles contaminés ou chez les individus directement exposés au pétrole.

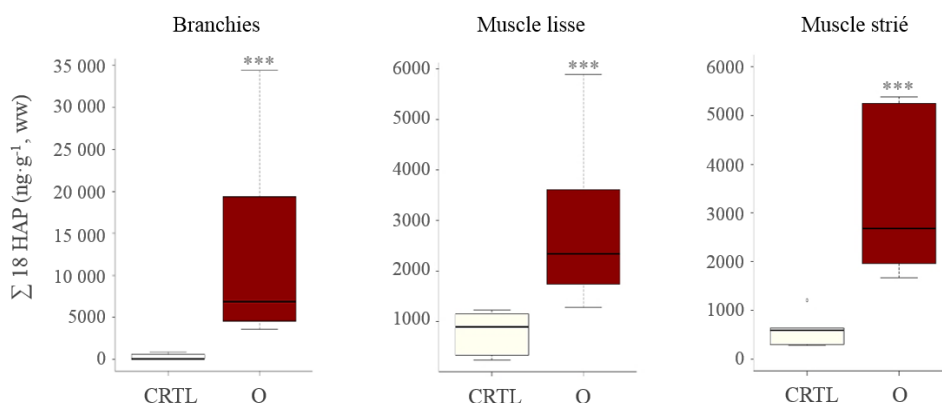


Figure 7.6. Somme des concentrations en HAP (18 composés parents, ng·g<sup>-1</sup> de poids frais) dans les branchies, les muscles lisses et les muscles striés des huitres contrôles (CTRL, n = 5 individus) et exposées au pétrole seul (O, n = 6 individus) à l'issue de 44 h d'exposition. \*\*\*, p < 0,001.

#### 7.2.4 Analyse du protéome du ganglion viscéral

Les analyses du protéome du ganglion viscéral ont été réalisées sur 5 huitres issues de la condition contrôle indirectement contaminée par le pétrole brut et sur 6 huitres directement contaminées par le pétrole brut. Elles ont permis l'identification de 5531 protéines.

Si on compare ce résultat avec le nombre de protéines identifiées dans le ganglion viscéral des huitres exposées au pétrole brut à de plus faibles concentrations (Chapitre 6, § 6.3 ; n = 5057 protéines identifiées), on est dans les mêmes ordres de grandeur. Cette comparaison montre donc que le ganglion viscéral des huitres exposées aux très fortes concentrations de pétrole ne présentait pas une quantité anormale de protéines. Comme le montre la Figure 7.7, la majorité des protéines identifiées est commune (n = 4362 protéines), 13 % sont spécifiques de l'exposition à 390 – 2800 µg·L<sup>-1</sup> (Chapitre 6, § 6.3) et 21 % sont spécifiques de l'exposition aux concentrations massives (≈ 400 mg·L<sup>-1</sup> ; Chapitre 7).

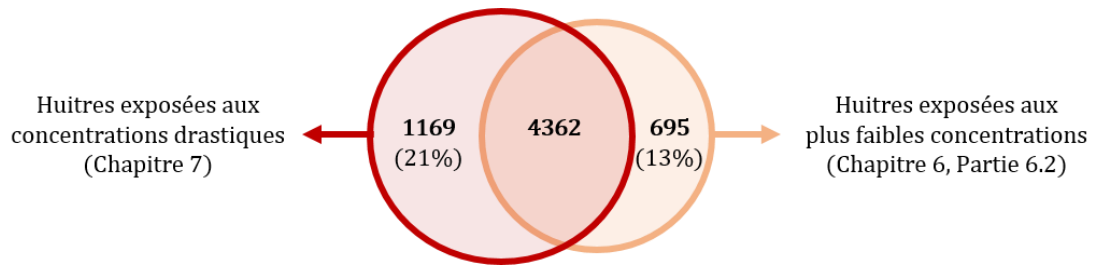


Figure 7.7 Distribution des protéines. Un total de 5531 protéines (4362 + 1169) a été identifié dans les ganglions viscéraux des huitres exposées aux concentrations drastiques de pétrole brut (Chapitre 7) et 5057 protéines (4362 + 695) a été identifié dans les ganglions viscéraux des huitres exposées aux plus faibles concentrations de pétrole brut (Chapitre 6, § 6.2). 4362 protéines sont communes. 1169 protéines (21 % des 5531 protéines identifiées) ne sont identifiées que chez les huitres exposées aux concentrations drastiques de pétrole et 695 protéines ne sont identifiées que chez les huitres exposées aux plus faibles concentrations de pétrole brut du Chapitre 6 (13 % des 5057 protéines identifiées).

Dans l'expérience d'exposition massive (Chapitre 7), la comparaison de l'abondance des protéines chez les huitres contrôles et directement exposées au pétrole brut n'a pas conduit à l'identification de protéines dont l'abondance était significativement différente ( $FDR < 1$ ). L'analyse « classique » utilisée dans les chapitres précédents conduit ici à comparer des huitres contrôles mais contaminées avec des huitres directement exposées et drastiquement contaminées (Fig. 7.6). Au vu de cette situation, nous proposons donc de nous attacher aux similitudes plutôt qu'aux différences qui n'existent statistiquement pas.

Pour ce faire, les protéines dont l'abondance est la plus proche entre les huitres contrôles contaminées et les huitres directement exposées au pétrole brut ont donc été sélectionnées ( $n = 229$  protéines avec  $FC \approx 1$  et  $p > 0,95$ ). L'analyse de l'enrichissement de ce groupe de protéines est présentée sur la Figure 7.8. Sans apporter trop de poids à ce type d'analyse, les résultats mettent en évidence l'implication de ces protéines dans les processus biologiques d'oxydoréduction et dans le transport des substances organiques (entités moléculaires contenant au moins un atome de carbone) à l'échelle intra- et intercellulaire, notamment au travers d'un transport transmembranaire actif.

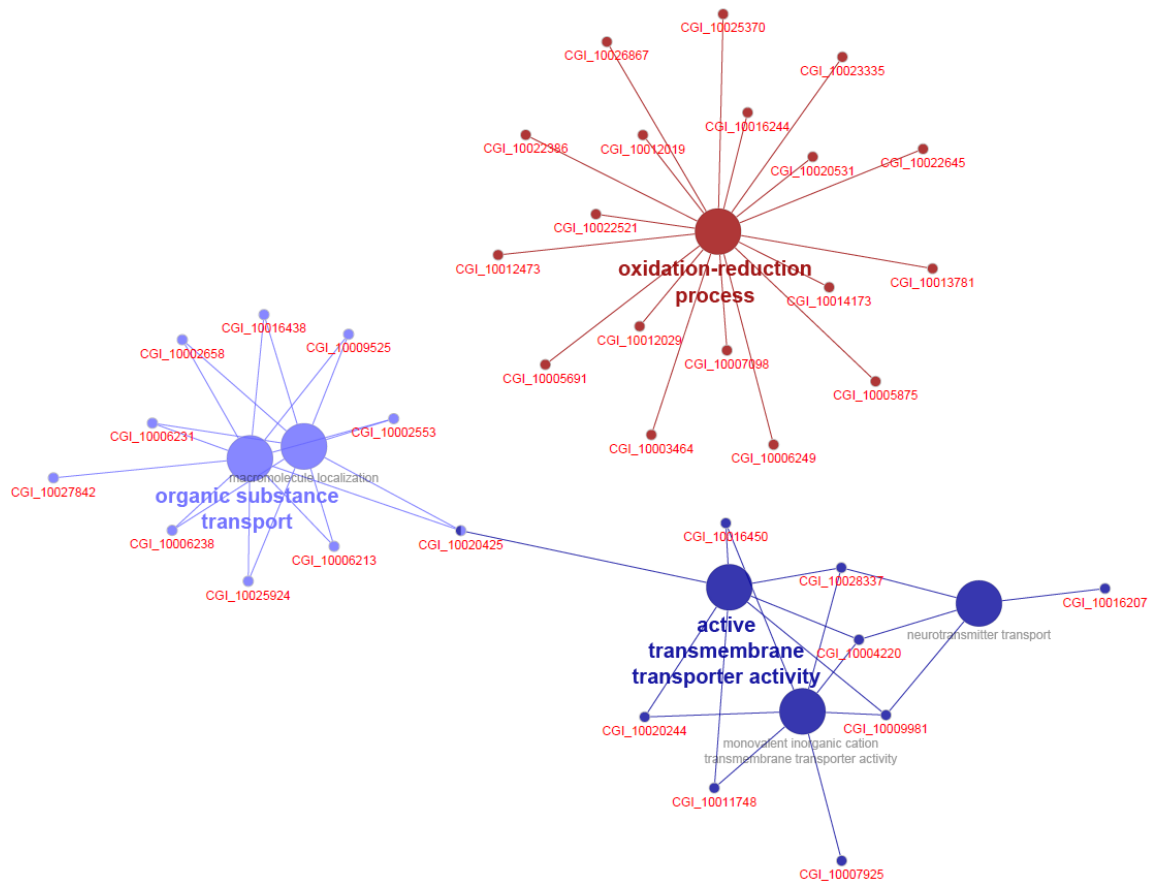


Figure. 7.8. Analyses fonctionnelles des protéines ( $FC \approx 1$  ;  $p > 0,95$ ) du ganglion viscéral des huitres. Réseaux fonctionnels réalisés avec les données Biological Process de Gene Ontology (GOBP ;  $p < 0,05$ ).

## 7.3 Conclusions

Au cours de ce chapitre, nous avons pu caractériser la réponse comportementale de l'huitre face à une concentration massive de pétrole brut. La réponse des huitres a été essentiellement caractérisée par une bouffée d'hyperventilation. Cette bouffée transitoire qui peut durer plusieurs heures est définie par une large amplitude d'ouverture, totalement anormale. L'amplitude d'ouverture est jusqu'à deux fois plus importante que celle précédant la contamination. Elle est associée à une très forte agitation, environ 50 fois plus importante durant la bouffée qu'en condition de repos. Cette agitation marquée des valves précède la franche augmentation de l'amplitude d'ouverture caractérisant la bouffée. Une telle réaction comportementale n'avait encore jamais été mise en évidence avec la Valvométrie HFNI (malgré une vingtaine d'années d'enregistrement du comportement et des milliers d'heures analysées) et traduit ainsi son caractère exceptionnel. Les huitres ont répondu, en moyenne, entre 15 et 30 min après le lancement de la contamination c'est-à-dire pour des concentrations théoriques de pétrole brut comprises entre 28 et 43 mg·L<sup>-1</sup>. Ces concentrations sont massives mais écologiquement réalistes. En effet, les valeurs en hydrocarbures pétroliers totaux autorisées dans les eaux de production rejetées, par exemple en Méditerranée, sont de 40 mg·L<sup>-1</sup> (moyennes mensuelles autorisées) avec des maximums journaliers autorisés de 100 mg·L<sup>-1</sup> (Lusnier et al., 2019 ; Neff, 2011 ; Veil, 2006 ; Zheng et al., 2016). La réaction des huitres, qui débute donc par une augmentation de l'agitation des valves puis par une bouffée massive et typique d'hyperventilation, est suivie (i) soit par la mort de l'huitre en quelques heures ou 1-2 jour, soit (ii) par de larges périodes de fermeture des valves entrecoupées par de brèves périodes d'ouverture qui retardent cette mort. Dans notre expérience, les huitres survivantes ont été échantillonnées à l'issue de 44 h d'exposition. Les dosages de HAP dans les tissus (branchies et muscles adducteurs) des huitres directement exposées et des huitres de la condition contrôle témoignent d'une très forte contamination des animaux exposés et d'une contamination des huitres contrôles. Des analyses de protéomique différentielle sur le ganglion viscéral des huitres (exposées *vs* contrôles) ont ensuite été réalisées. Ces analyses ont tout d'abord été comparées à celles réalisées dans le ganglion viscéral des huitres ayant participé aux expériences à de plus faibles concentrations de pétrole (Chapitre 6, § 6.2). Le nombre total de protéines identifiées est similaire et le nombre de protéines identiques largement majoritaire. Néanmoins, il est mis en évidence que 13 et 21 % des protéines identifiées sont spécifiques (Fig. 7.7) dénotant

ainsi l'effet de la concentration en pétrole. Puis, l'analyse spécifique qui a été entreprise à montrer l'absence de différence significative entre les huitres directement exposées aux concentrations massives et les huitres contrôles contaminées mais non directement exposées. Cette absence de différence statistique pourrait être attribuée au faible nombre d'individus analysés par rapport à la variabilité des résultats individuels, qui peut être reliée à la forte variabilité des niveaux de contamination des individus (Fig. 7.6). Pour aller plus loin, il aurait fallu un nombre supérieur d'analyses. L'analyse des protéines dont l'abondance est similaire entre les huitres directement exposées et les huitres contrôles contaminées montre des mécanismes fonctionnels liés aux processus d'oxydoréduction et de transport des substances organiques.



# CHAPITRE 8

DISCUSSION GENERALE  
ET CONCLUSIONS





## 8.1 Préambule

Les travaux présentés au cours de ce travail avaient pour objectif premier d'analyser la réponse comportementale de mollusques bivalves instrumentés avec la Valvométrie HFNI<sup>§</sup> (i), en présence de pétrole brut seul et (ii), en présence de pétrole brut dans un contexte multistress. La question centrale était de savoir si on peut avec cette technologie détecter la présence de pétrole brut dans l'eau lorsque d'autres facteurs de stress sont conjointement présents. Le but complémentaire était de mieux comprendre les changements physiologiques du milieu intérieur des mollusques bivalves sous-jacents aux modifications comportementales. Lorsque le comportement est perturbé par la présence de pétrole brut, quelles sont les modifications, à l'échelle du milieu intérieur, qui sont associées à ces perturbations ?

Afin de répondre à ces deux problématiques, et en recherchant une vision large et généraliste, plusieurs approches et démarches expérimentales ont été mises en place de façon complémentaire. Les études ont été réalisées chez deux espèces de mollusques bivalves, une d'eau de mer et une d'eau douce, en conditions semi-naturelles et en conditions de laboratoire, avec des concentrations de pétrole brut constantes ou variables, environnementales ou létales, et en présence de divers facteurs de stress : la température de l'eau, la turbidité, la présence de baryum (métal trace présent dans les eaux de production), de pollution sonore et d'hypoxie. Au cours de chacune des expérimentations réalisées, le comportement des bivalves a été suivi et analysé en continu avec la Valvométrie HFNI et des prélèvements biologiques ont été réalisés à différents temps clés afin d'évaluer les perturbations et la contamination du milieu intérieur (utilisation de la protéomique différentielle et de dosages de HAP sur des tissus cibles impliqués dans la production du comportement).

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ces travaux (qui ont donné lieu à trois articles publiés) est résumé et/ou discuté au sein de ce chapitre. L'apport scientifique dans un

---

<sup>§</sup> La Valvométrie HFNI, Haute Fréquence Non Invasive, est une technique de mesure de l'activité valvaire de mollusques bivalves qui permet, aussi bien sur le terrain qu'au laboratoire, de suivre le comportement de ces animaux avec un stress minimum ou nul. Le but poursuivi est de suivre ce comportement sans que l'animal s'aperçoive qu'il est étudié 24/7, sans intervention humaine, sur des périodes qui peuvent atteindre plusieurs années.

contexte opérationnel de biosurveillance de l'industrie pétrolière et gazière est également présenté.

## 8.2 Résumé des principaux résultats

Nous avons établi pour la première fois, la spécificité de la réponse comportementale de mollusques bivalves au pétrole brut avec la Valvométrie HFNI et nous avons confirmé la sensibilité et la reproductibilité de la méthode. Dans une démarche de symptomatologie, nous y avons associé des analyses du milieu intérieur en définissant dans des tissus spécifiques (i) l'état de la contamination par les HAP majeurs et (ii) l'état de la perturbation à l'échelle du protéome. *In fine*, quand on analysera en ligne et à distance une perturbation du comportement en relation avec la présence de pétrole brut dans le milieu, une meilleure appréciation des perturbations sous-jacentes pourra donc être opérée. Les principaux résultats de ces travaux de thèse sont présentés ci-dessous.

De nombreux paramètres environnementaux, qu'ils soient naturels ou anthropiques, sont en mesure de modifier le comportement des mollusques bivalves (Andrade et al., 2016). Parmi les paramètres considérés comme d'intérêt dans le cadre de ces travaux, la pollution sonore était celui dont les conséquences sur les bivalves étaient particulièrement mal connues. Afin de mieux les appréhender, nous avons réalisé une étude en conditions contrôlées de laboratoire chez l'huître. De façon générale, les résultats obtenus ont suggéré un effet dépresseur de la pollution sonore « lourde » (i.e. 92 passages de cargos / jour) chez les individus exposés, se soldant *in fine* par leur moindre croissance. Ces résultats ont été depuis confirmés par Shi et al. (2019).

En conditions semi-naturelles sur un site expérimental d'envergure, nous avons étudié le comportement de la palourde d'eau douce *C. fluminea* exposée à un pétrole brut seul ou additionné de pollution sonore « légère » (i.e. 4 – 7 passages de cargos / jour), de baryum ( $\approx 100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et de pulses de turbidité (3 h / jour,  $\approx 260 \text{ NTU}$ ) durant 10 jours. Ces facteurs de stress additionnels et leurs intensités ont été choisis dans une démarche de représentativité du milieu naturel. La réponse au pétrole brut à une concentration nominale constante de  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et mesurée de  $\approx 170 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a été caractérisée par une chute de

l'amplitude d'écartement des valves, une augmentation de la durée de fermeture et de l'agitation des valves pendant les périodes d'ouverture. Cette réponse comportementale s'est avérée discriminante en présence des autres facteurs de stress étudiés et en présence d'une chute parallèle de la température de l'eau. En ce qui concerne les perturbations du milieu intérieur des bivalves, les analyses du protéome ont été entreprises dans les branchies et l'ensemble muscles + ganglions nerveux de corbicules exposés uniquement au pétrole brut. Seules les branchies étaient significativement contaminées par les HAP dosés mais la contamination potentielle des ganglions nerveux n'a pas été exclue. Les changements majeurs mis en évidence sont (i) une diminution des processus métaboliques et cellulaires dans le pool muscles + ganglions associée à un impact toxicologique relativement faible et (ii) une augmentation des processus métaboliques et cellulaires dans les branchies avec un impact toxicologique relativement plus important que dans le pool muscles + ganglions. Deux scénarios spéculatifs mais réalistes, faisant intervenir la perception sensorielle, la contamination, les perturbations du système nerveux et musculaire, ont été analysés pour mettre en relation l'activité valvaire et les perturbations recensées dans le milieu intérieur des corbicules exposés au pétrole brut.

En conditions contrôlées de laboratoire, nous avons étudié le comportement d'un bivalve marin, l'huitre *M. gigas*. Avant d'être confrontées à différentes gammes de concentrations de pétrole brut, certaines huitres ont été préalablement exposées à la pollution sonore « lourde » (92 passages de cargos / jour) ou à l'hypoxie ( $PO_2 = 2-3$  kPa). Aux plus faibles concentrations de pétrole testées (concentrations nominales comprises entre 390 et 750  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; concentrations mesurées en HAP comprises entre  $\approx 120$  et 175  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 74 h d'exposition), la réponse comportementale des huitres a été caractérisée par une chute de l'amplitude d'ouverture et par une augmentation de l'agitation des valves durant les périodes d'ouverture, de façon cohérente avec la réponse caractérisée chez les corbicules. À ces concentrations, la réponse au pétrole n'a pas été clairement discernée en condition multistress\*\*. Dans l'ensemble des conditions d'exposition, les huitres ont ensuite fait face à l'augmentation des concentrations de pétrole brut (concentrations nominales de 2800  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; concentrations mesurées en HAP comprises entre  $\approx 1930$  et 4280  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 65 h d'exposition). Leur réponse a été caractérisée par une augmentation de l'amplitude

---

\*\* Cf § 2.6 (Chapitre 2) sur la question des expositions multistress et la nécessité de prendre en compte l'intensité relative des différents stress.

d'ouverture, par une diminution des durées de fermeture et par une augmentation de l'agitation des valves, qu'elle soit ou non pondérée par l'analyse uniquement durant les périodes d'ouverture. À ces concentrations, la réponse des huitres au pétrole a été discernée en conditions multistress. À l'issue de cette expérimentation de 8 jours, les dosages de HAP réalisés dans les huitres entières indiquent une contamination significative et relativement élevée des huitres exposées, sans différence significative entre les conditions d'exposition, mono- ou multistress. L'analyse du protéome du ganglion viscéral, élément majeur du système nerveux des huitres<sup>††</sup>, nous a permis de caractériser l'impact du pétrole sur le tissu nerveux. L'analyse montre un remaniement des activités métaboliques et cellulaires où la diminution apparaît comme la variation majoritaire. Un impact toxicologique relativement important a été observé dont l'induction du processus de cancérogenèse par exemple.

Enfin, le comportement de l'huitre face à des concentrations massives mais réalistes de pétrole brut de l'ordre de plusieurs dizaines de  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a été caractérisé par une extrême agitation des valves qui précède et se maintient durant la très large augmentation de leur amplitude d'écartement pouvant durer plusieurs heures. Cette réaction, sans précédent dans les nombreuses analyses comportementales réalisées à ce jour avec la Valvométrie HFNI, illustre le stress extrême causé par des concentrations en hydrocarbures qui coïncident avec celles pouvant être autorisées dans les eaux de production rejetées - avant dilution - dans le milieu naturel.

### **8.3 Mises en perspectives du comportement en présence de pétrole brut seul**

Un des buts initiaux de ces travaux était d'étudier la robustesse de la réponse comportementale (ou tout du moins de certaines de ces caractéristiques) chez des mollusques bivalves exposés au pétrole brut, et ce, quelles que soient les conditions environnementales ou expérimentales et l'espèce étudiée.

---

<sup>††</sup> Le ganglion viscéral de l'huitre a pu être disséqué dans des délais compatibles avec la réalisation d'analyses de protéomique, ce qui n'est pas le cas chez le corbicule, beaucoup plus petit.

**Quel type de pétrole brut ?** Le pétrole brut utilisé est un pétrole brut léger de mer du Nord. Ses caractéristiques sont mises en parallèle de celles d'autres pétroles connus dans le tableau ci-dessous (Tab. 8.1). Le pétrole brut utilisé y apparaît relativement proche du pétrole léger d'Arabie, du pétrole de Louisiane du Sud (en cause dans la catastrophe Deepwater Horizon), du pétrole d'Alberta, du versant nord de l'Alaska ou encore du Diesel, et plus éloigné de fluides plus lourds tels que le fioul n° 5 ou le 6303.

Tableau 8.1. Comparatif de caractéristiques du pétrole brut utilisé (1<sup>ère</sup> colonne) au cours de la thèse avec d'autres pétroles connus (d'après Wang et al., 2003).

	Pétrole utilisé	Arabian Light	South Louisiana	Alberta (ASMB)	Alaska North Slope	Fuel Oil No. 2 Diesel	Fuel Oil No. 5	Heavy Fuel Oil 6303
Teneur en H <sub>2</sub> S (%)	0	1,93	0,71	0,63	1,11	0,09	1,00	1,48
Densité (15 °C)	0,77	0,86	0,86	0,84	0,87	0,83	0,99	0,99
Viscosité dynamique (mPa·s ou cP, 15 °C)	1,02	13,0	10,1	6,1	11,5	2,76	1410	22800
Saturés (%)	84	75,5	80,8	77,3	75,0	88,2	44,2	42,5
Aromatiques (%)	15,5	15,2	12,6	16,8	15,0	10,2	39,5	29
Résines (%)	0,45	5,7	5,9	4,2	6,1	1,7	8,0	15,5
Asphaltènes (%)	0,05	3,6	0,8	1,7	4,0	0	8,4	13,0

**Quelles concentrations appliquées ?** Le comportement de mollusques bivalves a pu être caractérisé en fonction de différentes concentrations de pétrole brut dont les valeurs mesurées ont été mises en perspective de celles pouvant être recensées dans le milieu naturel sur la Figure 8.1 ci-dessous (gris pâle, valeurs testées ; noires, gammes environnementales). En conditions semi-naturelles et en douce, la palourde asiatique *C. fluminea* a été exposée durant 10 jours à une concentration constante de pétrole brut avec une valeur nominale de 400 µg·L<sup>-1</sup> et une valeur mesurée en HCT de ≈ 170 µg·L<sup>-1</sup> (Chapitre 5 ; § 5.1). En conditions de laboratoire et en eau de mer, l'huitre *M. gigas* a été exposée à une concentration nominale de 390 et 750 µg·L<sup>-1</sup> durant 74 h avec des concentrations mesurées en HAP au cours de cette période de ≈ 120 ng·L<sup>-1</sup> puis de ≈ 175 ng·L<sup>-1</sup>. Les huitres ont ensuite été exposées à une concentration nominale de 2800 µg·L<sup>-1</sup> durant 65 h avec des concentrations mesurées en HAP pendant cette période de ≈ 1930 ng·L<sup>-1</sup>, de ≈ 4280 ng·L<sup>-1</sup> puis de ≈ 3915 ng·L<sup>-1</sup>

(Chapitre 5 ; § 5.2). Également en conditions de laboratoire et en eau de mer, l’huitre *M. gigas* a été exposée à des concentrations d’exposition ayant graduellement atteint  $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (valeurs pouvant être mesurées dans des eaux de production rejetées en mer) durant la première heure d’exposition puis à une valeur qui a pu atteindre  $\approx 400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  durant les 43 h qui ont suivi (Concentrations théoriques, non mesurées ; Chapitre 7). L’ensemble des concentrations testées est dans la partie inférieure des valeurs relevées sur le terrain.

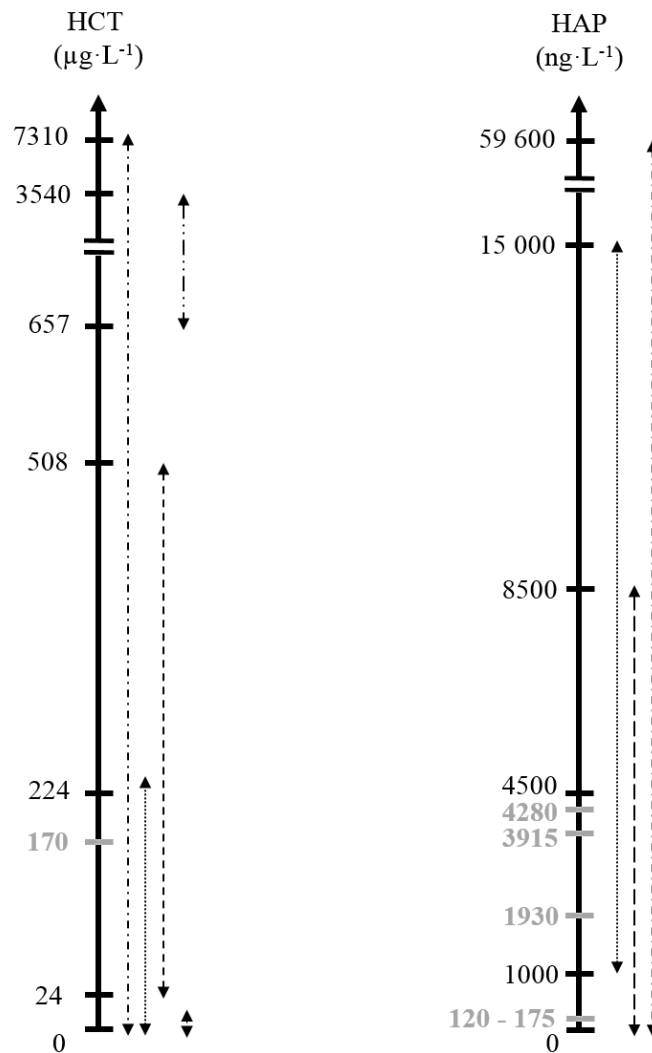


Figure 8.1. Mise en perspective des concentrations mesurées dans l’eau au cours des expérimentations réalisées (en gris pâle) avec des valeurs mesurées dans l’environnement (en noir). Ces valeurs sont celles recensées le Chapitre 2, § 2.3. Chaque flèche pointe sur les valeurs minimales et maximales relevées dans une étude en fonction des sites ou des temps d’échantillonnage (Guéguen et al., 2011 ; Incardona et al., 2014 ; Kim et al., 2013 ; Li et al., 2010 ; Sousa et al., 2018 ; Srinivasa Reddy et al., 2005 ; Stagg et McIntosh, 1996).

**Pour quelles réponses comportementales ?** Dans chacune de ces expérimentations, la réponse comportementale des bivalves a été caractérisée au travers de différents paramètres : l'amplitude d'écartement des valves (VOA), la durée de fermeture (VCD), l'agitation des valves globale (VA) et/ou l'agitation des valves pondérée (VAI ; agitation calculée pendant les périodes d'ouverture). La réponse comportementale des corbicules à une concentration nominale de  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a été caractérisée par une chute de l'amplitude d'ouverture des valves, une augmentation de la durée de fermeture et une augmentation de l'agitation des valves pondérée (Chapitre 5 ; § 5.2). Chez l'huître, au cours de la première expérimentation présentée (Chapitre 5 ; § 5.3), la réponse comportementale a tout d'abord été caractérisée aux concentrations nominales de  $390 - 750 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  par une diminution de l'amplitude d'ouverture et par une augmentation de l'agitation des valves pondérée. Puis, la réponse comportementale à la concentration nominale de  $2800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a été caractérisée par une augmentation de l'amplitude d'ouverture, une diminution des durées de fermeture et une augmentation de l'agitation des valves pondérée ou non. Lors de l'exposition aux valeurs représentatives d'eaux de production (Chapitre 7), la réponse des huitres a été essentiellement caractérisée par une bouffée extrême d'hyperventilation de plusieurs heures, caractérisée par une très large augmentation de l'amplitude d'ouverture ( $\approx 2$  fois plus importante qu'en référence) ainsi que par une très forte augmentation de l'agitation des valves ( $\approx 50$  fois plus importante qu'en référence). C'est uniquement au cours de cette expérimentation que nous avons observé une mortalité face au pétrole pendant l'expérimentation. À l'issue de cette réaction, les huitres « survivantes » ont présenté de larges périodes de fermeture entrecoupées par de très brèves périodes d'ouverture.

**Quelle cohérence avec la littérature ?** Il y a peu de données dans la littérature sur le sujet étudié c'est-à-dire l'impact du pétrole brut sur l'activité valvaire des mollusques bivalves. Le phénomène peut paraître étonnant au vu du nombre et de la variété des publications d'une part, sur l'impact du pétrole et d'autre part, sur des techniques valvométriques diverses. Quelques études ont analysé l'activité valvaire de mollusques bivalves durant une contamination par un pétrole brut et l'ont quantifiée au travers d'un ou de plusieurs paramètres. Parmi elles, Redmond et al. (2017) ont décrit le comportement de la moule marine *Mytilus edulis* face à un pétrole brut léger de Mer du Nord, en conditions contrôlées de laboratoire durant 4 jours, à 3 concentrations nominales différentes :  $15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et  $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Leurs résultats montrent une réduction significative de l'amplitude

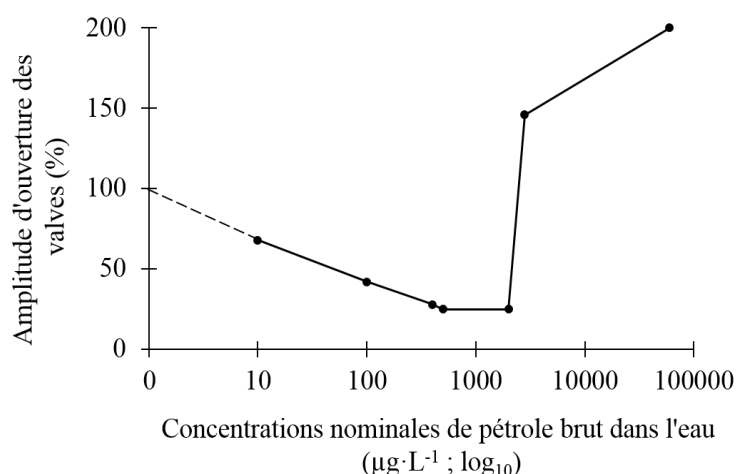


d'ouverture des valves aux concentrations d'exposition testées les plus élevées ( $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et  $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). L'évolution du comportement de ces moules exposées à un pétrole brut similaire à celui utilisé dans nos travaux est cohérente avec l'évolution du comportement des corbicules exposés à une concentration nominale de  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Chapitre 5 ; § 5.2) et au comportement des huitres exposées aux concentrations nominales comprises entre  $390$  et  $750 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Chapitre 5 ; § 5.3). Bénégui et al. (*in prep*) ont étudié le comportement de la palourde d'eau douce *C. fluminea* exposée à différentes concentrations nominales de pétrole brut léger de Mer du Nord ( $0, 10, 100, 500$  et  $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) durant 10 jours (avril 2014) en conditions semi-naturelles. Le site expérimental, les durées d'exposition, les valvomètres et l'acquisition des données, le pétrole brut, l'espèce et le nombre d'individus étudiés étaient identiques entre l'étude de Bénégui et al. (*in prep*) et l'étude présentée dans ce manuscrit (Chapitre 5 ; § 5.2). Les résultats de Bénégui et al. (*in prep*) mettent en évidence la diminution de l'amplitude d'ouverture et l'augmentation des durées de fermeture des corbicules en fonction des concentrations nominales d'exposition, et ce dès  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Nous pouvons ainsi appuyer deux faits qui apparaissent solides à ce jour. D'une part, le corbicule *C. fluminea*, l'huitre *M. gigas* et la moule *M. edulis* présentent le même type de réponse dans la « gamme basse » d'exposition (valeurs nominales de pétrole brut comprises entre  $10$  et  $2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), indépendamment de l'espèce et de la nature de leur milieu, eau douce ou eau salée, et de la saison. D'autre part, la réponse comportementale en conditions semi-naturelles est fiable et reproductible dans le temps malgré la différence de saison et de température de l'eau, dans une gamme au moins comprise entre  $\approx 7$  et  $14$  °C. D'autres études, réalisées en conditions de laboratoire chez des mollusques bivalves avec des concentrations plus élevées, paraissent en cohérence avec nos observations faites chez l'huitre lors de son exposition aux concentrations nominales de  $2800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Chapitre 5, § 5.3) et de l'ordre de plusieurs dizaines ou centaines de  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Chapitre 7). Staiken et al. (1979) ont par exemple rapporté une dépression de la contraction musculaire chez le bivalve marin *Mya arenaria* exposé durant 96 h à différentes concentrations de pétrole brut de Louisiane ( $50$  à  $800 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Hartwick et al. (1982) ont réalisé des contaminations d'une palourde marine, pendant 5 h / jour durant 5 jours avec  $100$  et  $1000 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de pétrole brut d'Alberta et ont rapporté deux panels de réponses comportementales distinctes. À  $100 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , les valves des palourdes étaient étroitement fermées et, lorsqu'elles s'ouvraient, la réaction de rétractation des siphons était normale. À  $1000 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , la réaction de rétractation des siphons était lente et une large béance de la coquille était observée lors de l'exposition

à l'air. Cette large béance était suivie d'une fermeture des valves avec, parfois, le pincement des siphons à l'extérieur de la coquille.

**Au bilan.** À l'instar des résultats comportementaux mis en évidence au cours de ces travaux et de ceux présents ou non dans la littérature scientifique, nous proposons l'existence d'un *continuum* de la réponse comportementale des bivalves exposés au pétrole brut. Il ne semble pas exister de différence fondamentale en fonction de l'espèce, du milieu, des conditions d'exposition ou des saisons. La Figure 8.2 présente le schéma global intégrant l'ensemble de nos observations et permet d'illustrer leur reproductibilité et complémentarité. Nous avons choisi l'amplitude d'ouverture des valves pour le réaliser car elle nous est apparue comme l'information la plus robuste, sensible et représentative de l'ensemble du comportement valvaire. Nous avons également choisi de nous limiter aux concentrations nominales d'exposition pouvant être écologiquement réalistes ainsi qu'aux périodes d'exposition durant lesquelles il n'a pas été recensé de mortalité significative (l'exposition de l'huitre à des concentrations strictement supérieures à  $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  est donc exclue de cette analyse). Au-delà de l'aspect de détection (présence - absence) du pétrole brut dans l'eau par l'analyse du comportement de mollusques bivalves, l'analyse comportementale va donc, avec ce type de schéma, vers un aspect quantitatif de la contamination de l'eau. Sans prétendre à fournir une concentration précise, le type de réponse comportementale pourrait nous suggérer la gamme de contamination de l'eau possible.

Figure 8.2. Schéma global représentant le *continuum* comportemental analysé avec la Valvométrie HFNI lors de l'exposition de bivalves au pétrole brut, quel que soit le milieu (eau douce ou eau de mer), l'espèce (*C. fluminea* ou *M. gigas*), les conditions expérimentales (semi-naturelles ou de laboratoire), la saison (hiver et printemps) ou l'année (2014 - 2016 - 2018).



## 8.4 Discrimination de la réponse comportementale au pétrole brut dans un contexte multistress

Au cours de ces travaux, l'ensemble des paramètres étudiés conjointement avec le pétrole brut a été choisi en fonction de situations pouvant refléter celles retrouvées dans le milieu naturel. En ce qui concerne l'expérimentation réalisée en conditions semi-naturelles avec les corbicules, nous avons travaillé avec les facteurs de stress, pollution sonore, baryum et pulses de turbidité. En conditions de laboratoire chez l'huitre, nous avons travaillé avec la pollution sonore et l'hypoxie.

**Pourquoi le baryum ?** Le baryum est un élément trace métallique présent de façon naturelle dans l'environnement et de façon majeure dans les fluides de forage et les eaux de production, des sous-produits issus de l'industrie du pétrole et du gaz offshore (un pétrolier peut produire plus d'eau de production que de pétrole). Le baryum fait partie des métaux majeurs retrouvés dans ces eaux de production à des concentrations élevées (Neff et al., 1987 ; 2011). En comparaison de l'eau de mer naturelle, les facteurs d'enrichissements peuvent atteindre des valeurs de l'ordre de 10 000 (Trefry et al., 1995) et dépassent fréquemment des valeurs de l'ordre de 1000 (Neff, 2002). En ce qui concerne la toxicité, Spangenberg and Cherr (1996) ont mis en évidence que le stade gastrula de la moule *Mytilus californianus* est affecté de manière similaire entre la contamination par une eau de production et la contamination par le baryum. Ces résultats sont en accord avec une étude réalisée par Higashi et al. (1992) où la toxicité de différentes fractions d'une eau de production avait été testée chez des embryons de la même espèce. Chez le poisson-zèbre, la perturbation de paramètres hormonaux a été mise en évidence lors d'une exposition de 21 jours à des concentrations de l'ordre de 80  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de baryum (plus faible concentration testée ; Kwon et al., 2016). A notre connaissance, il n'existe pas d'étude décrivant le comportement de mollusques bivalves adultes en présence de baryum bien qu'il soit en mesure d'interférer avec le métabolisme du potassium et de causer une stimulation musculaire (HSBD, 2012 ; INRS, 2012). Dans notre étude, les concentrations mesurées étaient comprises entre 90 et 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  soit environ 10 fois plus que le bruit de fond géochimique mesuré dans l'eau douce du Gave de Pau. De plus, il n'existe pas non plus à notre connaissance d'étude concernant les effets de cet élément en présence de pétrole brut.

**Pourquoi la pollution sonore ?** On pense que la pollution sonore sous-marine générée par l'activité humaine est responsable d'effets dommageables sur la faune aquatique (de Soto, 2016) mais l'essentiel des travaux est orienté vers les mammifères marins. Parmi les études réalisées, très peu l'étaient sur les mollusques bivalves au démarrage de la thèse (Ellers, 1995 ; Lillis et al., 2013 ; Peng et al., 2016 ; Roberts et al., 2015 ; Solan et al., 2016 ; Vazzana et al., 2016). En 2017, Charifi et al. avaient caractérisé au laboratoire d'Arcachon la capacité de perception du son par l'huitre dans la gamme 10 – 1000 Hz par une approche comportementale basée sur la réaction de fermeture transitoire des valves. D'après les auteurs, l'huitre est donc en capacité de percevoir des sons générés naturellement dans l'environnement et des bruits d'origine anthropique tels que les bruits de cargo, de forages pétroliers et de plateforme d'extraction en activité. Lors de l'étude présentée dans le Chapitre 4, nous nous sommes attachés à comprendre les conséquences de la pollution sonore chez cette espèce. L'ensemble des résultats obtenus a montré un effet répressif de la pollution sonore sur le plan comportemental, ventilatoire et métabolique, se soldant par une croissance moindre des huitres exposées. Ces résultats, qui ont depuis été confirmés par Shi et al. (2019), nous ont confortés dans l'étude de ce type de pollution conjointement au pétrole. Au cours de ces travaux, deux protocoles expérimentaux ont été mis en place : (i) lors des expérimentations de laboratoire chez l'huitre, le protocole présenté dans le chapitre 4 (92 passages de cargos / jour), représentatif d'un port actif a été utilisé alors que (ii), lors de l'expérimentation en conditions semi-naturelles chez les corbicules, un protocole d'exposition plus léger, de seulement 4 à 7 passages de cargo par jour a été utilisé.

**Pourquoi la turbidité ?** Les épisodes de turbidité font partie des changements naturels et fondamentaux survenant dans l'environnement aquatique. Au cours de ces travaux, les concentrations utilisées durant les pulses de turbidité étaient comprises entre 200 et 300 NTU. Ces valeurs, qui sont des valeurs environnementales, peuvent être mesurées dans l'estuaire de la Gironde par exemple (Fuentes-Cid et al., 2014). Chez l'huitre exposée à un milieu turbide, on observe une diminution de la surface d'attache du muscle adducteur, effecteur de son comportement, avec l'augmentation de la turbidité (estuaire de la Loire ; gradient compris entre 24,1 – 630,4 mg·L<sup>-1</sup> ; Dutertre et al., 2009). Le phénomène pourrait refléter un effet sur l'activité valvaire. De plus, en présence de pétrole et de matière en suspension, des agrégats avec certains composés tels que les HAP peuvent se former

naturellement et donc interférer avec les processus de contamination (Loh et al., 2018 ; Sun and Zheng, 2009).

**Pourquoi l'hypoxie ?** Les phénomènes d'hypoxie sont en développement dans de multiples masses d'eau, aussi bien en haute mer qu'en eaux côtières, en liaison avec l'anthropisation et le changement climatique (Breitburg et al., 2018). Ils sont couramment définis par une concentration en O<sub>2</sub> inférieure ou égale à 2 mg·L<sup>-1</sup> (c'est-à-dire à une pression partielle d'oxygène dans l'eau  $PO_2 \leq 4$  kPa, à 15 °C ; 21 kPa est la valeur de la pression partielle d'O<sub>2</sub> dans une eau équilibrée à l'air). Divers processus physiologiques sont perturbés chez les invertébrés aquatiques en présence de ces phénomènes (Galic et al., 2019). Une hypoxie à  $PO_2 = 4$  kPa stimule l'activité ventilatoire de *C. fluminea* et conduit à l'augmentation de sa contamination par le cadmium avec la modification de la distribution tissulaire de cet élément (Tran et al., 2001 ; 4 kPa  $\approx$  4 % d'O<sub>2</sub> dans l'eau ; = 2 mg·L<sup>-1</sup> à 15 °C). Toujours chez le corbicule, des conditions hypoxiques de 4 kPa entraînent une augmentation de la durée d'ouverture des valves ainsi qu'une augmentation de la bioaccumulation d'uranium dans les branchies (Tran et al., 2005). Au cours de nos expérimentations chez l'huitre, nous avons appliqué des concentrations en oxygène de 2-3 kPa ( $\approx$  2-3 % d'O<sub>2</sub> dans l'eau ou 1-1,5 mg·L<sup>-1</sup> à 15 °C). Ce type de pression partielle correspond à la pression partielle critique (P<sub>c</sub>) à partir de laquelle l'activité ventilatoire de la majorité des organismes aquatiques est ralentie. Comme nous l'avons précédemment décrit, la ventilation augmente avec la diminution de l'oxygénation jusqu'à une valeur critique de  $\approx$  3-4 kPa. À l'inverse, en dessous de P<sub>c</sub>, la ventilation ralentit car l'oxygénation du milieu intérieur, qui ne peut plus être maintenue, devient limitante pour le métabolisme oxydatif des cellules. L'activité des muscles ventilatoires diminue alors (Massabuau et Abele, 2011).

**La réponse comportementale est-elle discriminante en présence de facteurs de stress additionnels ?** Pour répondre à cette question, nous avons choisi de travailler à des niveaux de stress additionnels environnementalement réalistes. Mais nous montrons également, en fait sans grande surprise, qu'il faut prendre en compte l'intensité respective de l'ensemble des facteurs de stress. Or c'est un point que l'on voit peu ou pas abordé dans la littérature sur la problématique multistress. Au cours de nos travaux, nous avons abordé ce problème en étudiant la réponse au pétrole brut à 2 niveaux différents de pollution sonore.

La Figure 8.3, représente sur le même principe que la Figure 2.8 du § 2.6 (Chapitre 2), les intensités relatives des différents stress. Chez les corbicules, en conditions semi-naturelles, la réponse comportementale caractérisée en présence de pétrole brut à la concentration nominale de  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a été retrouvée en présence additionnelle de pollution sonore « légère » : 4 à 7 passages de cargos par jour (Chapitre 5 ; § 5.2). Dans ce cas, la puissance du stimulus pétrole brut ( $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  nominal) a donc été supérieure à celle de la pollution sonore (4 – 7 cargos / jour), du baryum ( $90 - 100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) comme elle l'a été à celles des pulses de turbidité (3 h / jour,  $\approx 260 \text{ NTU}$ ) et de la concentration de baryum testée.

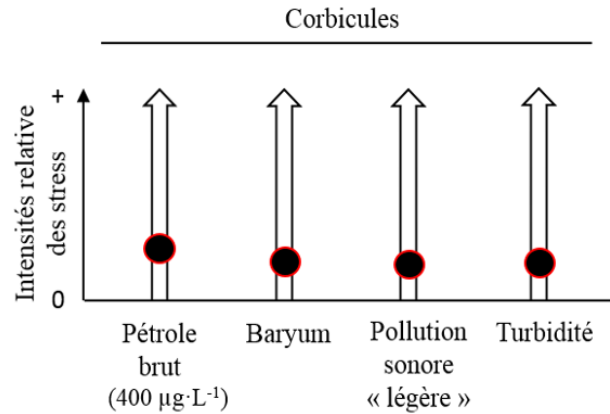


Figure 8.3. Schéma conceptuel d'une situation multistress introduisant la notion de pression de contamination. Ici, les corbicules ont été exposés à une pollution sonore « légère » de 4 à 7 cargos/jour.

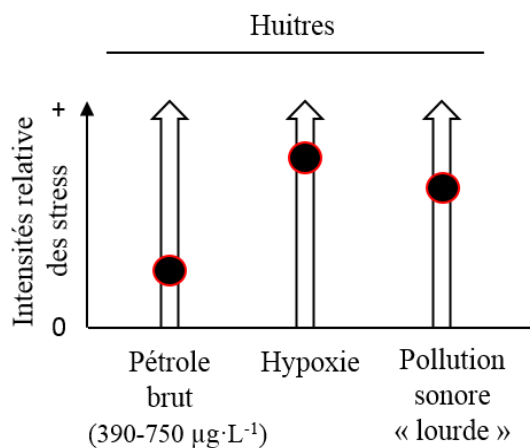
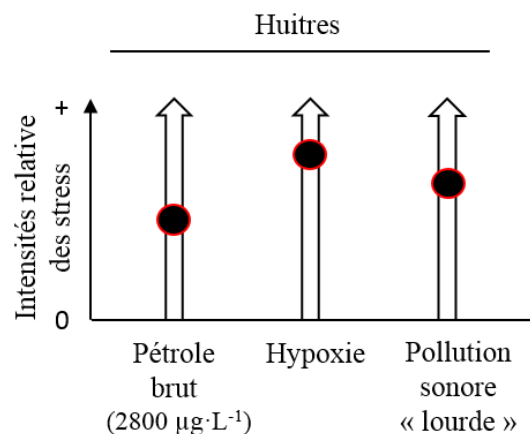


Figure 8.4. Schéma conceptuel d'une situation multistress introduisant la notion de pression de contamination. Ici, la concentration nominale de pétrole brut était de  $390-750 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  chez des huitres exposées à une pollution sonore « lourde » de 92 cargos/jour.

Par contre, au laboratoire, nous avons exposé les huitres à une pollution sonore plus « lourde » : 92 passages de cargos / jour, comme illustré schématiquement sur la Figure 8.4. La contamination par le pétrole était de  $390-750 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Chapitre 5 ; § 5.3), même ordre de grandeur que pour les corbicules à Lacq. Dans cette situation la réponse au pétrole brut n'a pas été retrouvée. Nous avons alors augmenté la concentration de pétrole comme illustré sur la Figure 8.5. Dans cette situation, la réponse caractéristique au pétrole a alors été retrouvée.

L'hypoxie testée,  $\text{PO}_2 \approx 2-3 \text{ kPa}$  était une hypoxie très forte, aux limites de capacité de maintien du métabolisme aérobie chez le bivalve (Massabuau et Abele, 2011). Nous n'avons pas observé de réponse comportementale au pétrole brut aux concentrations nominales de  $390-750 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Par contre la réponse était présente à la concentration de  $2800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Figure 8.5. Schéma conceptuel d'une situation multistress introduisant la notion de pression de contamination. Ici, la concentration nominale de pétrole brut était de  $2800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  chez des huitres exposées à une pollution sonore « lourde » de 92 cargos/jour



Les Figures 8.4 et 8.5 résument donc la situation en mettant en évidence le problème de l'intensité relative des différents facteurs.

À la lecture de revues récentes sur le problème du multistress (Jackson et al., 2016 ; Nøges et al., 2016), il nous semble que ce problème de poids relatif des stress est peu ou pas discuté. Nos travaux sur l'impact du pétrole brut à deux niveaux de pression sonore différents illustrent pourtant son importance.

## 8.5 Relations entre activité valvaire et perturbations du milieu intérieur des bivalves exposés au pétrole brut

Les analyses des perturbations de l'activité valvaire et du milieu intérieur des bivalves ont été obtenues (i) à la suite de l'exposition des corbicules à une concentration constante de pétrole brut en conditions semi-naturelles durant 3 jours à une concentration nominale de  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (concentration mesurée, HCT  $\approx 170 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) et (ii), à la suite de l'exposition des huitres à des concentrations variables de pétrole brut en conditions de laboratoire durant 8 jours à des concentrations nominales comprises entre 390 et  $2800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (concentrations mesurées en HAP comprises entre  $\approx 120$  et  $\approx 4280 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Les perturbations du milieu intérieur sont issues d'analyses réalisées sur des tissus liés à l'établissement de l'activité valvaire des bivalves : l'ensemble muscles + ganglions nerveux des corbicules et le ganglion viscéral de l'huitre, particulièrement développé chez cette espèce et pouvant être apparenté à son système nerveux central (Galtsoff, 1964 ; Sugawara, 1964). Les différentes étapes qui se succèdent pour la mise en place d'un comportement approprié chez les organismes

vivants suite à la perception d'un ou plusieurs stimuli peuvent être résumées comme suit. À l'issue de la perception d'un stimulus environnemental, l'information sensorielle est intégrée centralement par les organismes. Des réactions physiologiques secondaires peuvent alors survenir et, ensemble, les changements physiologiques centraux et périphériques déterminent les réponses comportementales aux stimuli. Les changements comportementaux peuvent alors, à leur tour, influencer les processus physiologiques et la réponse à des stimuli ultérieurs (Scott et Sloman, 2004). Chez les corbicules ou chez les huitres, la perception sensorielle de la qualité de l'eau peut tout d'abord se faire au travers des nombreux chémorécepteurs présents au niveau du siphon inhalant des corbicules ainsi que sur les bords du manteau des huitres et des corbicules. La perception sensorielle peut ensuite également se faire par l'intermédiaire du transit de l'eau contaminée au travers des branchies richement innervées. Le message nerveux est alors intégré au sein du système nerveux des bivalves, c'est-à-dire au sein d'un ou de plusieurs de leurs ganglions. Diverses réactions physiologiques sont alors en mesure d'advenir mais nous nous sommes notamment attachés à mieux comprendre (i), les perturbations physiologiques des muscles adducteurs des corbicules puisqu'ils sont les effecteurs du mouvement des valves ainsi que (ii), les perturbations engendrées « en amont » en analysant directement les perturbations touchant le système nerveux des corbicules et des huitres. Chez les corbicules, où nous avons analysé le protéome de l'ensemble muscles + ganglions nerveux, nous avons montré que la diminution de l'activité nerveuse des ganglions (viscéraux et/ou cérébraux) pouvait conduire à la diminution de l'activité (métabolique et cellulaire) des muscles adducteurs qui à leur tour pourraient conduire à la diminution de l'activité valvaire des corbicules. Chez l'huitre, où nous avons pu nous focaliser sur le ganglion viscéral uniquement, nous avons confirmé qu'une exposition au pétrole brut était bien en mesure de perturber spécifiquement l'activité de ce centre nerveux. Les analyses réalisées ont révélé un remaniement des processus métaboliques et cellulaires avec un ralentissement d'activité qui apparaît être la variation majoritaire. L'impact toxicologique apparaît aussi important (induction des voies de la cancérogenèse par exemple) sans qu'il soit possible d'en envisager toutes les conséquences. Ci-dessous, nous proposons un schéma bilan synthétique récapitulant ces résultats et permettant de traduire la cascade d'évènements pouvant conduire à la modification de l'activité valvaire des bivalves en présence de pétrole brut (Fig. 8.6).



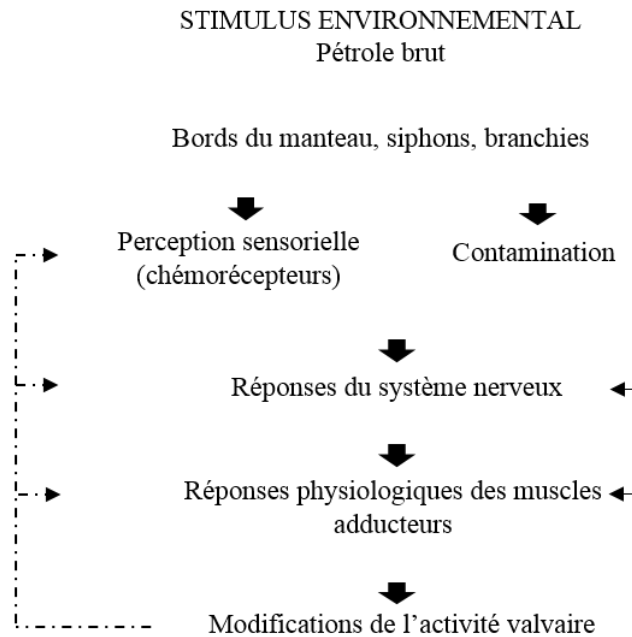


Figure 8.6. Schéma bilan permettant de visualiser la cascade d'évènements pouvant conduire à la modification de l'activité valvaire des bivalves en présence de pétrole brut.

## 8.6 Les points clés retenus pour les aspects opérationnels

### Quels sont les atouts de la Valvométrie HFNI retenus par l'industriel ?

L'industriel a retenu un certain nombre de points, qui sont pour lui les atouts de la valvométrie HFNI et de l'analyse du comportement, pour la surveillance du milieu aquatique autour de ses installations industrielles. Ci-dessous, l'extrait de la page web<sup>\*\*</sup> correspondante.

#### « Un système de biosurveillance in situ

Tous les organismes vivants peuvent détecter des perturbations causées à leur habitat. Une propriété qui se retrouve notamment dans les espèces marines. Forts de ce constat, nous avons mis en place une collaboration avec le CNRS et l'Université de Bordeaux pour identifier lesquels de ces organismes seraient les plus à même de fournir *in situ*, et en continu, un indicateur global de la qualité de l'eau.

À la clé, une technologie des plus performantes : **la valvométrie haute fréquence non invasive (HFNI)**, qui utilise des coquillages bivalves. Dotés d'un degré de sensibilité sans équivalent, ces

<sup>\*\*</sup> <https://www.ep.total.com/fr/innovations/best-innovators/best-innovators-2018/des-coquillages-bivalves-pour-une-biosurveillance>

mollusques permettent de surveiller en continu et sans intervention humaine la qualité des eaux à proximité de nos installations. Et ainsi de détecter à un stade précoce l'éventuelle présence d'hydrocarbures.

Le principe : équiper ces mollusques regroupés en valvomètres de micro-électroaimants positionnés sur les deux faces de leurs coquilles. Les électrodes génèrent un courant électromagnétique d'une fréquence de 10 Hz, suffisante pour suivre en continu l'activité de fermeture et d'ouverture des coquilles, sans induire de stress chez l'animal. En analysant les cycles d'ouverture et de fermeture des valves, on peut ainsi identifier en temps réel toute modification de comportement, synonyme de perturbation du milieu marin.

### **Un pilote en conditions réelles dans le golfe Arabique**

Ce projet faisant l'objet de recherche depuis 2012, plusieurs essais ont déjà été conduits en laboratoire, en milieu semi-ouvert ou encore sur des sites naturels, comme en mer de Barents. Mais une nouvelle étape a été franchie en 2017 avec le pilote de démonstration lancé sur une plateforme *offshore* de Total ABK, dans le Golfe Arabique. Cette première mondiale dans le domaine du biomonitoring a ainsi vu l'installation de deux valvomètres équipés d'huîtres perlières locales (*Pinctada radiata*), à proximité de sondes physico-chimiques.

Placés à deux profondeurs d'eau différentes, ces valvomètres permettent l'enregistrement quotidien de plus de 2,5 millions de données, envoyées en continu à une station de réception distante pour traitement et stockage. Si la campagne ne se conclura qu'au cours de l'été, elle a d'ores et déjà corroboré l'efficacité de cette technologie en conditions industrielles et opérationnelles réelles, avec des résultats très concluants en termes de caractérisation du comportement des mollusques, grâce au suivi de leurs cycles circadiens et circatidaux. Le pilote industriel a également confirmé son potentiel de détection des événements anthropiques, tels que la présence d'irisation d'hydrocarbures.

### **Une technologie innovante, au service de notre acceptabilité**

Les atouts de cette technologie en termes de surveillance du milieu naturel et détection précoce des perturbations industrielles sont nombreux :

- une sensibilité aux polluants 10 à 100 fois supérieure à celle des capteurs physico-chimiques usuels ;
- une acquisition de données en continu, alors que les méthodes usuelles procèdent par échantillonnages ponctuels ;
- une analyse au minimum de l'ordre de 15 à 300 fois moins chère que les approches actuelles, sur tout type de site industriel ;
- une très faible consommation d'énergie, puisque la puissance requise est inférieure à 1 watt et que l'alimentation électrique peut se faire aussi grâce à un panneau solaire ;
- une absence de maintenance pendant plus de deux ans minimum ;
- une intervention humaine limitée : pose sans recours à des plongeurs ; contrôle à distance grâce à une interface utilisateur en temps réel via Internet...
- une déclinaison aussi bien en mer qu'en eaux douces, et ce quelle que soit la température.

Véritable rupture technologique en matière de *monitoring* environnemental, la valvométrie représente aussi un formidable outil d'engagement sociétal et d'acceptabilité auprès de nos parties prenantes. En recourant à des espèces locales, nous facilitons la transparence et le partage de notre performance environnementale. Une appropriation qui ne s'arrête pas là, puisque nos parties prenantes peuvent également avoir accès à l'interface des résultats. »

## 8.7 Perspectives de recherche

À l'issue de ces travaux, de multiples perspectives de recherche peuvent être suggérées.

Tout d'abord, en ce qui concerne la robustesse de la réponse comportementale des mollusques bivalves face au pétrole brut, on pourrait préciser le *continuum* comportemental maintenant que des grandes lignes sont proposées. Augmenter la finesse d'analyse du comportement en fonction de différentes gammes de concentrations de pétrole brut pourrait conduire à développer l'aspect quantitatif de la Valvométrie HFNI, bien que l'étude du comportement n'ait pas pour objectif la détermination d'une concentration précise et ne remplacera par ailleurs jamais les dosages chimiques.

Dans un contexte opérationnel, les analyses des périodes de post-exposition et d'exposition à répétition à différentes concentrations devraient être poursuivies et spécifiquement étudiées. On doit en effet envisager qu'à partir de certaines concentrations des effets internes irréversibles apparaissent sans entraîner de mortalité à court terme. Quels sont les délais de retour à un comportement « normal » ? Quelle est la gamme de concentrations qui permet un retour à ce comportement « normal » ? Dans quelle gamme de concentration les réponses comportementales sont-elles comparables lors d'expositions à répétitions ? La sensibilité à la concentration d'exposition est-elle maintenue lors d'expositions répétées ? Ces questions sont posées ici pour la valvométrie mais il faut bien sûr garder en mémoire qu'elles sont génériques pour tous les appareils de mesure qu'on utilise hors de la gamme pour laquelle ils ont été fabriqués ou calibrés.

Au cours de ces travaux, nous avons décrit la réponse comportementale face à diverses concentrations de pétrole brut dont des concentrations massives et courtes mais qu'elles seraient les conséquences d'exposition chronique à des concentrations très faibles et longues ?

On connaît tout l'intérêt d'un site expérimental comme celui des Rivières Pilotes à Lacq pour des études en milieu semi-naturel. Pourrions-nous imaginer expérimenter dans un système équivalant à celui des Rivières Pilotes en milieu marin ?

Nous avons travaillé avec un seul pétrole brut léger de Mer du Nord mais les observations auraient-elles été les mêmes avec un autre pétrole, moins léger par exemple ?

L'exploitation du gaz naturel en offshore se développe. Quel est le potentiel de la valvométrie avec ce type de produit ?

À l'heure actuelle, c'est l'expertise humaine qui permet d'interpréter les modifications de comportement qu'on observe chez les mollusques bivalves lors d'une exposition à un contaminant. Or nos travaux de thèse suggèrent très fortement que nombre de ces comportements sont stéréotypés. Depuis de nombreuses années déjà, au laboratoire EPOC, nous réalisons la détection automatique de la mortalité (Sow, unpublished data) et des pontes (Ahmed et al., 2015 ; Sow, unpublished data). On a aussi commencé à réaliser la détection automatique d'un certain nombre d'autres aspects du comportement valvaire. La voie s'ouvre donc vers le développement de l'intelligence artificielle, ou plus justement de l'intelligence augmentée par ordinateur, pour pouvoir faire de l'analyse automatisée à grande échelle du comportement par valvométrie HFNI.

Enfin, dans un contexte plus biologique et fondamental, on peut largement progresser dans la compréhension des perturbations induites par le pétrole brut et d'autres facteurs de stress. Il serait très intéressant d'aller plus loin dans la démarche de compréhension des modifications du milieu intérieur vues au travers de la seule lecture de l'activité valvaire en ligne et à distance. Dans cette optique nous avons montré que l'analyse du ganglion viscéral de l'huître, véritable petit cerveau, est faisable et pertinente. Continuer dans cette voie d'analyse spécifique apparaît d'un intérêt certain dans le cadre des études en écotoxicologie mais aussi pour mieux comprendre l'éthologie des invertébrés marins.



# CHAPITRE 9

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES



- Agah, H., Mehdinia, A., Bastami, K.D., Rahmanpour, S., 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in the surface water and sediments of Chabahar Bay, Oman Sea. *Marine Pollution Bulletin* 115, 515–524. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.032>
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2007. Toxicological profile for Benzene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Amiard-Triquet, C., 2009. Behavioral Disturbances: The Missing Link between Sub-Organismal and Supra-Organismal Responses to Stress? Prospects Based on Aquatic Research. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 15, 87–110. <https://doi.org/10.1080/10807030802615543>
- Anderson, K., Taylor, D.A., Thompson, E.L., Melwani, A.R., Nair, S.V., Raftos, D.A., 2015. Meta-Analysis of Studies Using Suppression Subtractive Hybridization and Microarrays to Investigate the Effects of Environmental Stress on Gene Transcription in Oysters. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118839>
- 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. *Frontiers in Marine Science*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00187>
- Auby, I., Trut, G., Gouriou, L., Oger-Jeanneret, H. 2013. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans les huîtres du Bassin d'Arcachon. Comparaison avec les teneurs mesurées dans les autres masses d'eau du bassin Adour Garonne. Réflexions établies sur la base de l'exploitation des données RNO, ROCCH, DCE. RST /ODE/UL/LER/AR/13-009. <https://doi.org/10.13155/27779>
- Bae, M.-J., Park, Y.-S., 2014. Biological early warning system based on the responses of aquatic organisms to disturbances: A review. *Science of The Total Environment* 466–467, 635–649. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.075>
- Bassères, A., Simonet, F., Lafont, M., Coste, M., Narbonne, J.F., 2004. Validation of biomarkers for impact evaluation of aqueous industrial waste in mesocosms. *Water Sci. Technol.* 49, 123–130.
- Baumard, P, Budzinski, H., Garrigues, P., 1998. PAHs in Arcachon Bay, France: Origin and biomonitoring with caged organisms. *Marine Pollution Bulletin* 36, 577–586. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(98\)00014-9](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(98)00014-9)
- Baumard, Pascale, Budzinski, H., Garrigues, P., 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western Mediterranean Sea. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 765–776. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170501>



- Baussant, T., Bechmann, R.K., Taban, I.C., Larsen, B.K., Tandberg, A.H., Bjørnstad, A., Torggrimsen, S., Naevdal, A., Øysaed, K.B., Jonsson, G., Sanni, S., 2009. Enzymatic and cellular responses in relation to body burden of PAHs in bivalve molluscs: a case study with chronic levels of North Sea and Barents Sea dispersed oil. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1796–1807. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.08.007>
- Bayne, B., Anglès d'Auriac, M., 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.048>
- Bayona, Y., Roucaute, M., Cailleaud, K., Lagadic, L., Bassères, A., Caquet, T., 2014. Isotopic niche metrics as indicators of toxic stress in two freshwater snails. *Science of The Total Environment* 484, 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.005>
- Bénégui, J., Tran, D., Cailleaud, K., Dalens, J.M., Ciret, P., Sow, M., Bassères, A., Blanc P., Massabuau J.C. *In prep.* Dose relationship for a behavioural endpoint in Asiatic clam *Corbicula fluminea* exposed to various concentrations of crude oil under outdoor conditions.
- Bindea, G., Galon, J., Mlecnik, B., 2013. CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics* 29, 661–663. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt019>
- Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Fridman, W.-H., Pagès, F., Trajanoski, Z., Galon, J., 2009. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 25, 1091–1093. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101>
- Blanc, P., Ducastel, B., Cazin, J., Al Blooshi, M., Al Dhaheri, S.S., Al, Ali, Marzooqi, M., Maneux, E., Ciret, P., Sow, M., Massabuau, J.C., 2017. First-time implementation of innovative in situ biotechnology on an offshore platform in Arabian Gulf for continuous water quality monitoring and early leak detection. *Old Spe J.* <https://doi.org/10.2118/188821-MS>.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.12.027>
- Breitburg, D., Levin, L.A., Oschlies, A., Grégoire, M., Chavez, F.P., Conley, D.J., Garçon, V., Gilbert, D., Gutiérrez, D., Isensee, K., Jacinto, G.S., Limburg, K.E., Montes, I., Naqvi, S.W.A., Pitcher, G.C., Rabalais, N.N., Roman, M.R., Rose, K.A., Seibel, B.A., Telszewski, M., Yasuhara, M., Zhang, J., 2018. Declining oxygen in the global ocean and coastal waters. *Science* 359. <https://doi.org/10.1126/science.aam7240>

- Brinkmann, U., Eichelbaum, M., 2001. Polymorphisms in the ABC drug transporter gene MDR1. *Pharmacogenomics J* 1, 59–64. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500001>
- Britton, J.C., Morton, B., 1982. A dissection guide, field and laboratory manual for the introduced bivalve *Corbicula fluminea*. *Malacological Review*.
- Broman, D., Näuf, C., Lundbergh, I., Zebühr, Y., 1990. An in situ study on the distribution, biotransformation and flux of polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs) in an aquatic food chain (seston-*Mytilus edulis* L.-*Somateria mollissima* L.) from the baltic: An ecotoxicological perspective. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9, 429–442. <https://doi.org/10.1002/etc.5620090404>
- Bullock, T. H., Horridge, G. A. 1965. Structure and function in the nervous systems of invertebrates. San Francisco and London, Freeman and Co.
- Burnstock, G., 2006. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends in Pharmacological Sciences* 27, 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.01.005>
- Bustamante, P., Luna-Acosta, A., Clemens, S., Cassi, R., Thomas-Guyon, H., Warnau, M., 2012. Bioaccumulation and metabolisation of (14)C-pyrene by the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed via seawater. *Chemosphere* 87, 938–944. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.049>
- Cailleaud, K., Bassères, A., Gelber, C., Postma, J.F., Schure, A.T.M. ter, Leonards, P.E.G., Redman, A.D., Whale, G.F., Spence, M.J., Hjort, M., 2019. Investigating predictive tools for refinery effluent hazard assessment using stream mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 38, 650–659. <https://doi.org/10.1002/etc.4338>
- Campbell, P. 2003. “How might hypoxia affect metal speciation, accumulation and toxicity: some speculation”. In: *Proceedings Seventh International Symposium on Fish Physiology, Toxicology, and Water Quality*, Tallinn, Estonia, p. 125-147.
- Campos, A., Tedesco, S., Vasconcelos, V., Cristobal, S., 2012. Proteomic research in bivalves. *Journal of Proteomics* 75, 4346–4359. <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2012.04.027>
- Carls, M.G., Holland, L., Larsen, M., Collier, T.K., Scholz, N.L., Incardona, J.P., 2008. Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles. *Aquatic Toxicology* 88, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.03.014>
- 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. *Mar Biol* 152, 329–338. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0693-1>
- Charifi, M., Miserazzi, A., Sow, M., Perrigault, M., Gonzalez, P., Ciret, P., Benomar, S., Massabuau, J.-C., 2018. Noise pollution limits metal bioaccumulation and growth rate in a

- filter feeder, the Pacific oyster *Magallana gigas*. PLOS ONE 13, e0194174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194174>
- Charifi, M., Sow, M., Ciret, P., Benomar, S., Massabuau, J.-C., 2017. The sense of hearing in the Pacific oyster, *Magallana gigas*. PLOS ONE 12, e0185353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185353>
- Chrousos, G.P., 1998. Stressors, Stress, and Neuroendocrine Integration of the Adaptive Response: The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. Annals of the New York Academy of Sciences 851, 311–335. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09006.x>
- Claisse, D., 1989. Chemical contamination of French coasts: The Results of a Ten Years Mussel Watch. Marine Pollution Bulletin 20, 523–528. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(89\)90141-0](https://doi.org/10.1016/0025-326X(89)90141-0)
- Cocchieri, R.A., Arnese, A., Minicucci, A.M., 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from Italian central Mediterranean coasts. Marine Pollution Bulletin 21, 15–18. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(90\)90146-Y](https://doi.org/10.1016/0025-326X(90)90146-Y)
- Colvin, K.A., Lewis, C., Galloway, T.S., 2020. Current issues confounding the rapid toxicological assessment of oil spills. Chemosphere 245, 125585. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125585>
- Colwell, R.R., Walker, J.D., Cooney, J.J., 1977. Ecological Aspects of Microbial Degradation of Petroleum in the Marine Environment. CRC Critical Reviews in Microbiology 5, 423–445. <https://doi.org/10.3109/10408417709102813>
- Crain, C.M., Kroeker, K., Halpern, B.S., 2008. Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. Ecol. Lett. 11, 1304–1315. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01253.x>
- Daling, P.S., Leirvik, F., Almås, I.K., Brandvik, P.J., Hansen, B.H., Lewis, A., Reed, M., 2014. Surface weathering and dispersibility of MC252 crude oil. Mar. Pollut. Bull. 87, 300–310. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.07.005>
- Danovaro, R., Carugati, L., Berzano, M., Cahill, A.E., Carvalho, S., Chenuil, A., Corinaldesi, C., Cristina, S., David, R., Dell'Anno, A., Dzhembekova, N., Garcés, E., Gasol, J.M., Goela, P., Féral, J.-P., Ferrera, I., Forster, R.M., Kurekin, A.A., Rastelli, E., Marinova, V., Miller, P.I., Moncheva, S., Newton, A., Pearman, J.K., Pitois, S.G., Reñé, A., Rodríguez-Ezpeleta, N., Saggiomo, V., Simis, S.G.H., Stefanova, K., Wilson, C., Lo Martire, M., Greco, S., Cochrane, S.K.J., Mangoni, O., Borja, A., 2016. Implementing and Innovating Marine Monitoring Approaches for Assessing Marine Environmental Status. Front. Mar. Sci. 3. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00213>

- Davoodi, F., Claireaux, G., 2007. Effects of exposure to petroleum hydrocarbons upon the metabolism of the common sole *Solea solea*. *Marine Pollution Bulletin* 54, 928–934. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.03.004>
- de Soto, 2016. Peer-Reviewed Studies on the Effects of Anthropogenic Noise on Marine Invertebrates: From Scallop Larvae to Giant Squid, in: Popper, A.N., Hawkins, A. (Eds.), *The Effects of Noise on Aquatic Life II, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York, pp. 17–26.
- Dell’Omo, G., 2002. *Behavioural Ecotoxicology*. John Wiley & Sons.
- Di Toro, D.M., McGrath, J.A., Hansen, D.J., 2000. Technical basis for narcotic chemicals and polycyclic aromatic hydrocarbon criteria. I. Water and tissue. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 1951–1970. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190803>
- Diercks, A.-R., Highsmith, R.C., Asper, V.L., Joung, D., Zhou, Z., Guo, L., Shiller, A.M., Joye, S.B., Teske, A.P., Guinasso, N., Wade, T.L., Lohrenz, S.E., 2010. Characterization of subsurface polycyclic aromatic hydrocarbons at the Deepwater Horizon site. *Geophysical Research Letters* 37. <https://doi.org/10.1029/2010GL045046>
- Dityatev, A., Schachner, M., 2003. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* 4, 456–468. <https://doi.org/10.1038/nrn1115>
- Dityatev, A., Schachner, M., Sonderegger, P., 2010. The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nature Reviews Neuroscience* 11, 735–746. <https://doi.org/10.1038/nrn2898>
- Douben, P.E.T. 2003. *PAHs: An Ecotoxicological Perspective*, 1st ed, 2003. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470867132>
- Dragsund, I., Kompen, M., Holmslet, E., Sønneland, E., Christie, O., 2013. The Biota Guard marine oil leak monitoring system - novel sampling application of bivalve PAT biosensors. *TOS forum* 2013, 15. <https://doi.org/10.1255/tosf.6>
- Dutertre, M., Barillé, L., Beninger, P.G., Rosa, P., Gruet, Y., 2009. Variations in the pallial organ sizes of the invasive oyster, *Crassostrea gigas*, along an extreme turbidity gradient. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 85, 431–436. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.09.007>
- Eganhouse, R.P., Calder, J.A., 1976. The solubility of medium molecular weight aromatic hydrocarbons and the effects of hydrocarbon co-solutes and salinity. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 40, 555–561. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(76\)90223-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(76)90223-4)
- Ellers, O., 1995. Discrimination Among Wave-Generated Sounds by a Swash-Riding Clam. *The Biological Bulletin* 189, 128–137. <https://doi.org/10.2307/1542463>

- Elston, T., Wang, H., Oster, G., 1998. Energy transduction in ATP synthase. *Nature* 391, 510–513. <https://doi.org/10.1038/35185>
- Ertl, N.G., O'Connor, W.A., Wiegand, A.N., Elizur, A., 2016. Molecular analysis of the Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) CO<sub>2</sub> stress response. *Climate Change Responses* 3. <https://doi.org/10.1186/s40665-016-0019-y>
- Escher, B.I., Eggen, R.I.L., Schreiber, U., Schreiber, Z., Vye, E., Wisner, B., Schwarzenbach, R.P., 2002. Baseline toxicity (narcosis) of organic chemicals determined by in vitro membrane potential measurements in energy-transducing membranes. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1971–1979.
- Fakhru'l-Razi, A., Pendashteh, A., Abdullah, L.C., Biak, D.R.A., Madaeni, S.S., Abidin, Z.Z., 2009. Review of technologies for oil and gas produced water treatment. *Journal of Hazardous Materials* 170, 530–551. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.05.044>
- Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Long, E.R., 2000. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquat. Toxicol.* 51, 115–138. [https://doi.org/10.1016/s0166-445x\(00\)00082-5](https://doi.org/10.1016/s0166-445x(00)00082-5)
- Foster, G.D., Baksi, S.M., Means, J.C., 1987. Bioaccumulation of trace organic contaminants from sediment by baltic clams (*Macoma balthica*) and soft-shell clams (*Mya arenaria*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 6, 969–976. <https://doi.org/10.1002/etc.5620061209>
- Fournier, E., Tran, D., Denison, F., Massabuau, J.-C., Garnier-Laplace, J., 2004. Valve closure response to uranium exposure for a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*): quantification of the influence of pH. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1108–1114.
- French-McCay, D.P., 2002. Development and application of an oil toxicity and exposure model, OilToxEx. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2080–2094.
- Fuentes-Cid, A., Etcheber, H., Schmidt, S., Abril, G., De-Oliveira, E., Lepage, M., Sottolichio, A., 2014. Dynamics of coarse particulate matter in the turbidity maximum zone of the Gironde Estuary. *Comptes Rendus Geoscience* 346, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.crte.2014.03.001>
- Gainey, L.F., Walton, J.C., Greenberg, M.J., 2003. Branchial Musculature of a Venerid Clam: Pharmacology, Distribution, and Innervation. *The Biological Bulletin* 204, 81–95. <https://doi.org/10.2307/1543498>
- Galgani, F., Martínez-Gómez, C., Giovanardi, F., Romanelli, G., Caixach, J., Cento, A., Scarpato, A., BenBrahim, S., Messaoudi, S., Deudero, S., Boulahdid, M., Benedicto, J., Andral, B., 2011. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in mussels

- (*Mytilus galloprovincialis*) from the Western basin of the Mediterranean Sea. *Environ Monit Assess* 172, 301–317. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1335-5>
- Galic, N., Hawkins, T., Forbes, V.E., 2019. Adverse impacts of hypoxia on aquatic invertebrates: A meta-analysis. *Science of The Total Environment* 652, 736–743. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.225>
- Galler, S., 2008. Molecular basis of the catch state in molluscan smooth muscles: a catchy challenge. *J Muscle Res Cell Motil* 29, 73. <https://doi.org/10.1007/s10974-008-9149-6>
- Galtsoff, P. S. 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). In: *Fishery Bulletin* 64, p. 1-480.
- Garcia-March, J.R., Jiménez, S., Sanchis, M.A., Monleon, S., Lees, J., Surge, D., Tena-Medialdea, J., 2016. In situ biomonitoring shows seasonal patterns and environmentally mediated gaping activity in the bivalve, *Pinna nobilis*. *Marine Biology* 163. <https://doi.org/10.1007/s00227-016-2812-3>
- Gerhardt, A., 2007. Aquatic Behavioral Ecotoxicology - Prospects and Limitations. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 13, 481–491. <https://doi.org/10.1080/10807030701340839>
- GESAMP, 2007. IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/IAEA/UN/UNEP/UNIDO Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection. Report of the Thirty-fourth Session, Paris, 8-11 May 2007. Reports and Studies, GESAMP No.(77), 83 pp.
- Gesto, M., Tintos, A., Soengas, J.L., Míguez, J.M., 2006. Effects of acute and prolonged naphthalene exposure on brain monoaminergic neurotransmitters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 144, 173–183. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.002>
- Gesto, M., Tintos, A., Soengas, J.L., Míguez, J.M., 2009. beta-Naphthoflavone and benzo(a)pyrene alter dopaminergic, noradrenergic, and serotonergic systems in brain and pituitary of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.03.007>
- Goldberg, E.D., Bowen, V.T., Farrington, J.W., Harvey, G., Martin, J.H., Parker, P.L., Risebrough, R.W., Robertson, W., Schneider, E., Gamble, E., 1978. The Mussel Watch. *Envir. Conserv.* 5, 101–125. <https://doi.org/10.1017/S0376892900005555>
- Golden, P.L., Pollack, G.M., 2003. Blood–Brain Barrier Efflux Transport. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92, 1739–1753. <https://doi.org/10.1002/jps.10424>
- Green, J., Trett, M.W. (Eds.), 1989. *The Fate and Effects of Oil in Freshwater*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-1109-3>

- Guedes-Dias, P., Holzbaur, E.L.F., 2019. Axonal transport: Driving synaptic function. *Science* 366. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9997>
- Guéguen, M., Amiard, J.-C., Arnich, N., Badot, P.-M., Claisse, D., Guérin, T., Vernoux, J.-P., 2011. Shellfish and residual chemical contaminants: hazards, monitoring, and health risk assessment along French coasts. *Rev Environ Contam Toxicol* 213, 55–111. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6_3)
- Guengerich, F.P., 2000. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 21, 345–351. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.345>
- Guo, X., Feng, C., 2018. Biological toxicity response of Asian Clam (*Corbicula fluminea*) to pollutants in surface water and sediment. *Science of The Total Environment* 631–632, 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.019>
- Haberkorn, 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, 1191–1197. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.03.034>
- Hahn, M.E., 1998. The aryl hydrocarbon receptor: A comparative perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 121, 23–53. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)10028-2](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10028-2)
- 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, 333–338. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2015.09.207>
- Halsey, L.G., Killen, S.S., Clark, T.D., Norin, T., 2018. Exploring key issues of aerobic scope interpretation in ectotherms: absolute versus factorial. *Rev Fish Biol Fisheries* 28, 405–415. <https://doi.org/10.1007/s11160-018-9516-3>
- Hamood, A.W., Marder, E., 2014. Animal-to-Animal Variability in Neuromodulation and Circuit Function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 79, 21–28. <https://doi.org/10.1101/sqb.2014.79.024828>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hartmann, J.T., Beggel, S., Auerswald, K., Stoeckle, B.C., Geist, J., 2016. Establishing mussel behavior as a biomarker in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 170, 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.06.014>
- Hartwick, E.B., Wu, R.S.S., Parker, D.B., 1982. Effects of a crude oil and an oil dispersant (Corexit 9527) on populations of the littleneck clam (*Protothaca staminea*). *Marine Environmental Research* 6, 291–306. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(82\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0141-1136(82)90043-5)

- Hauser-Davis, R.A., Lopes, R.M., Zioli, R.L., 2019. Inhibition of mullet (*M. liza*) brain acetylcholinesterase activity by in vitro polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Marine Pollution Bulletin* 140, 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.01.027>
- Hellou, J., 2011. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environ Sci Pollut Res* 18, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0367-2>
- Higashi, R., G.N. Cherr, C. Bergens and T. W.-M. Fan. 1992. An approach to toxicant isolation from a produced water source in the Santa Barbara Channel. In J.P. Ray and F.R. Englehardt, eds., *Produced Water: Technological/Environmental Issues and Solutions*. Plenum, New York, NY, USA, pp. 223–234.
- Hoffmann, U., Kroemer, H.K., 2004. The ABC Transporters MDR1 and MRP2: Multiple Functions in Disposition of Xenobiotics and Drug Resistance. *Drug Metabolism Reviews* 36, 669–701. <https://doi.org/10.1081/DMR-200033473>
- HSBD, 2012. Barium Compounds - In: HSDB. NLM, 2012. <http://toxnet.nlm.nih.gov>
- IARC, 2010. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures, Lyon, France, pp. 1-853
- Incardona, J.P., Day, H.L., Collier, T.K., Scholz, N.L., 2006. Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology* 217, 308–321. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.09.018>
- Incardona, J.P., Gardner, L.D., Linbo, T.L., Brown, T.L., Esbaugh, A.J., Mager, E.M., Stieglitz, J.D., French, B.L., Labenia, J.S., Laetz, C.A., Tagal, M., Sloan, C.A., Elizur, A., Benetti, D.D., Grosell, M., Block, B.A., Scholz, N.L., 2014. Deepwater Horizon crude oil impacts the developing hearts of large predatory pelagic fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E1510-1518. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320950111>
- INRS, 2012. Baryum et composés. Fiche toxicologique n°125. [www.inrs.fr/fichetox](http://www.inrs.fr/fichetox)
- Iosifidou, H.G., Kilikidis, S.D., Kamarianos, A.P., 1982. Analysis for polycyclic aromatic hydrocarbons in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Thermaikos gulf, Greece. *Bull Environ Contam Toxicol* 28, 535–541. <https://doi.org/10.1007/bf01605580>
- Jackson, M.C., Loewen, C.J.G., Vinebrooke, R.D., Chimimba, C.T., 2016. Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis. *Global Change Biology* 22, 180–189. <https://doi.org/10.1111/gcb.13028>
- Jálová, V., Jarošová, B., Bláha, L., Giesy, J.P., Ocelka, T., Grabic, R., Jurčíková, J., Vrana, B., Hilscherová, K., 2013. Estrogen-, androgen- and aryl hydrocarbon receptor mediated



activities in passive and composite samples from municipal waste and surface waters. *Environment International* 59, 372–383. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.024>

Jenny, M.J., Walton, W.C., Payton, S.L., Powers, J.M., Findlay, R.H., O'Shields, B., Diggins, K., Pinkerton, M., Porter, D., Crane, D.M., Tapley, J., Cunningham, C., 2016. Transcriptomic evaluation of the American oyster, *Crassostrea virginica*, deployed during the Deepwater Horizon oil spill: Evidence of an active hydrocarbon response pathway. *Marine Environmental Research* 120, 166–181. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.08.006>

Jiang, M., Li, L., Li, Y., Shen, G., Shen, X., 2017. Oxidative Stress in Shellfish *Sinonovacula constricta* Exposed to the Water Accommodated Fraction of Zero Sulfur Diesel Oil and Pinghu Crude Oil. *Arch Environ Contam Toxicol* 73, 294–300. <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0391-z>

Käll, L., Canterbury, J.D., Weston, J., Noble, W.S., MacCoss, M.J., 2007. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat. Methods* 4, 923–925. <https://doi.org/10.1038/nmeth1113>

Khursigara, A.J., Ackerly, K.L., Esbaugh, A.J., 2019. Oil toxicity and implications for environmental tolerance in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 220, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.03.003>

Kim, M., Hong, S.H., Won, J., Yim, U.H., Jung, J.-H., Ha, S.Y., An, J.G., Joo, C., Kim, E., Han, G.M., Baek, S., Choi, H.-W., Shim, W.J., 2013. Petroleum hydrocarbon contaminations in the intertidal seawater after the Hebei Spirit oil spill – Effect of tidal cycle on the TPH concentrations and the chromatographic characterization of seawater extracts. *Water Research* 47, 758–768. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.050>

Knutzen, J., Sortland, B., 1982. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in some algae and invertebrates from moderately polluted parts of the coast of Norway. *Water Research* 16, 421–428. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(82\)90166-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(82)90166-X)

Könemann, H., 1981. Quantitative structure-activity relationships in fish toxicity studies. Part 1: relationship for 50 industrial pollutants. *Toxicology* 19, 209–221. [https://doi.org/10.1016/0300-483x\(81\)90130-x](https://doi.org/10.1016/0300-483x(81)90130-x)

Kraemer, L. R., Lott, S. 1977. Microscopic anatomy of the visceral mass of *Corbicula* (Bivalvia: Sphaeriacea). *Bull. Al. Malacol. Union, Inc.*, 1977 pp. 45-56.

Kramer, K.J.M., Jenner, H.A., Zwart, D. de, 1989. The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. *Hydrobiologia* 188–189, 433–443. <https://doi.org/10.1007/BF00027811>

- Krishnakumar, P., Casillas, E., Varanasi, U., 1994. Effect of environmental contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washington, USA. I. Cytochemical measures of lysosomal responses in the digestive cells using automatic image analysis. *Marine Ecology Progress Series* 106, 249. <https://doi.org/10.3354/meps106249>
- Kwon, B., Ha, N., Jung, J., Kim, P.-G., Kho, Y., Choi, K., Ji, K., 2016. Effects of Barium Chloride Exposure on Hormones and Genes of the Hypothalamic-Pituitary-Gonad Axis, and Reproduction of Zebrafish (*Danio rerio*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 96, 341–346. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1731-9>
- Lacroix, C., Coquillé, V., Guyomarch, J., Auffret, M., Moraga, D., 2014. A selection of reference genes and early-warning mRNA biomarkers for environmental monitoring using *Mytilus* spp. as sentinel species. *Marine Pollution Bulletin* 86, 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.06.049>
- Lacroix, C., Le Cuff, N., Receveur, J., Moraga, D., Auffret, M., Guyomarch, J., 2014. Development of an innovative and “green” stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–tandem mass spectrometry method for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota. *Journal of Chromatography A* 1349, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.094>
- Landrum, P.F., Dupuis, W.S., Kukkonen, J., 1994. Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated pyrene and phenanthrene in *Diporeia* spp.: Examination of equilibrium-partitioning theory and residue-based effects for assessing hazard. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 1769–1780. <https://doi.org/10.1002/etc.5620131108>
- Lee, R.F., Sauerheber, R., Benson, A.A., 1972. Petroleum hydrocarbons: uptake and discharge by the marine mussel *Mytilus edulis*. *Science* 177, 344–346.
- Lefebvre, G., 1978. *Chimie des hydrocarbures*. Editions TECHNIP.
- Legeay, A., Achard-Joris, M., Baudrimont, M., Massabuau, J.-C., Bourdineaud, J.-P., 2005. Impact of cadmium contamination and oxygenation levels on biochemical responses in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Aquatic Toxicology* 74, 242–253. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.05.015>
- Lemos, M.F.L., Soares, A.M.V.M., Correia, A.C., Esteves, A.C., 2010. Proteins in ecotoxicology - how, why and why not? *Proteomics* 10, 873–887. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900470>
- Li, Y., Zhao, Y., Peng, S., Zhou, Q., Ma, L.Q., 2010. Temporal and spatial trends of total petroleum hydrocarbons in the seawater of Bohai Bay, China from 1996 to 2005. *Marine Pollution Bulletin* 60, 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.09.020>

- Lillis, A., Eggleston, D.B., Bohnenstiehl, D.R., 2013. Oyster Larvae Settle in Response to Habitat-Associated Underwater Sounds. *PLoS ONE* 8, e79337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079337>
- Liu, D., Pan, L., Yang, H., Wang, J., 2014. A physiologically based toxicokinetic and toxicodynamic model links the tissue distribution of benzo[a]pyrene and toxic effects in the scallop *Chlamys farreri*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37, 493–504. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.01.005>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Livingstone, D.R., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 120, 43–49. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10008-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10008-9)
- Loh, A., Yim, U.H., Ha, S.Y., An, J.G., 2018. A preliminary study on the role of suspended particulate matter in the bioavailability of oil-derived polycyclic aromatic hydrocarbons to oysters. *Science of The Total Environment* 643, 1084–1090. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.129>
- López-Landavery, E.A., Amador-Cano, G., Alejandri, N., Ramirez-Álvarez, N., Montelongo, I., Díaz, F., Galindo-Sánchez, C.E., 2019. Transcriptomic response and hydrocarbon accumulation in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) exposed to crude oil. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 225, 108571. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108571>
- Luna-Acosta, A., Budzinski, H., Le Menach, K., Thomas-Guyon, H., Bustamante, P., 2015. Persistent organic pollutants in a marine bivalve on the Marennes-Oléron Bay and the Gironde Estuary (French Atlantic Coast)—Part 1: Bioaccumulation. *Science of The Total Environment* 514, 500–510. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.071>
- Lunt, S.Y., Fendt, S.-M., 2018. Metabolism – A cornerstone of cancer initiation, progression, immune evasion and treatment response. *Current Opinion in Systems Biology*, • Regulatory and metabolic networks • Special Section: Single cell and noise 8, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.12.006>
- Lusinier, N., Seyssiecq, I., Sambusiti, C., Jacob, M., Lesage, N., Roche, N., 2019. Biological Treatments of Oilfield Produced Water: A Comprehensive Review. *SPE Journal* 24, 2135–2147. <https://doi.org/10.2118/195677-PA>

- Mackie, A.M., Adron, J.W., Grant, P.T., 1980. Chemical nature of feeding stimulants for the juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.). *Journal of Fish Biology* 16, 701–708. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1980.tb03749.x>
- Mahringer, A., Fricker, G., 2016. ABC transporters at the blood–brain barrier. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 12, 499–508. <https://doi.org/10.1517/17425255.2016.1168804>
- Marceau F. 1909. Recherche sur la morphologie, l'histologie et la physiologie comparée des muscles adducteurs des mollusques acéphales. *Arch. Zool. Exp. Gén.* (ser 5), 2:295-469.
- Mason, R.P. 1988. Accumulation and depuration of petroleum hydrocarbons by black mussels. 1. Laboratory exposure trials. *South African Journal of Marine Science* 6, 143–153. <https://doi.org/10.2989/025776188784480582>
- Massabuau, J.-C., Abele, D. 2012. Principles of oxygen uptake and tissue oxygenation in water-breathing animals. *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. John Wiley & Sons, Ltd; pp. 139-156.
- Massabuau, J.-C., 2001. From low arterial- to low tissue-oxygenation strategy. An evolutionary theory. *Respiration Physiology* 128, 249–261. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(01\)00305-X](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(01)00305-X)
- Massabuau, J.-C., Burtin, B., Wheathly, M., 1991. How is O<sub>2</sub> consumption maintained independent of ambient oxygen in mussel *Anodonta cygnea*? *Respiration Physiology* 83, 103–113. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(91\)90096-2](https://doi.org/10.1016/0034-5687(91)90096-2)
- Massabuau, J.-C., Forgue, J., 1996. A field vs laboratory study of blood O<sub>2</sub>-status in normoxic crabs at different temperatures. *Canadian Journal of Zoology* 74, 423–430. <https://doi.org/10.1139/z96-049>
- Massabuau, J.-C., Gudimov, A., Blanc, P., 2015. Environmental Monitoring of Arctic Waters with Unmanned Bivalve Biosensor Technology: One Year of Background Data Acquisition in the Barents Sea. Presented at the SPE Russian Petroleum Technology Conference, Society of Petroleum Engineers. <https://doi.org/10.2118/176681-MS>
- McCarty, L.S., Mackay, D., Smith, A.D., Ozburn, G.W., Dixon, D.G., 1993. Residue-based interpretation of toxicity and bioconcentration QSARs from aquatic bioassays: polar narcotic organics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 25, 253–270. <https://doi.org/10.1006/eesa.1993.1024>
- McCull, J.D., Rossiter, R.J., 1951. Lipids of the nervous system of the squid *Loligo pealii*. *J. Exp. Biol.* 28, 116–124.

- McElroy, A., Leitch, K., Fay, A., 2000. A survey of *in vivo* benzo[alpha]pyrene metabolism in small benthic marine invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 50, 33–38. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00054-4)
- Meador, J., 2003. Bioaccumulation of PAHs in Marine Invertebrates. pp. 147–171. <https://doi.org/10.1002/0470867132.ch9>
- Meador, J.P., Rice, C.A., 2001. Impaired growth in the polychaete *Armandia brevis* exposed to tributyltin in sediment. *Marine Environmental Research* 51, 113–129. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00033-7](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00033-7)
- Meador, J.P., Stein, J.E., Reichert, W.L., Varanasi, U., 1995. Bioaccumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Marine Organisms, in: Ware, G.W. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York, New York, NY, pp. 79–165. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2542-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2542-3_4)
- Medler, S., Silverman, H., 2001. Muscular alteration of gill geometry *in vitro*: implications for bivalve pumping processes. *Biol. Bull.* 200, 77–86. <https://doi.org/10.2307/1543087>
- Miao, J., Pan, L., Liu, N., Xu, C., Zhang, L., 2011. Molecular cloning of CYP4 and GSTpi homologues in the scallop *Chlamys farreri* and its expression in response to Benzo[a]pyrene exposure. *Marine Genomics* 4, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2011.03.002>
- Miles, A.K., Roster, N., 1999. Enhancement of polycyclic aromatic hydrocarbons in estuarine invertebrates by surface runoff at a decommissioned military fuel depot. *Marine Environmental Research* 47, 49–60. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(98\)00104-4](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(98)00104-4)
- Millecamps, S., Julien, J.-P., 2008. Les dys-fonctionnements du transport axonal dans les neuropathies et motoneuronopathies. Dysfunction of axonal transport in neuropathies and motor neuron diseases. <https://doi.org/10.1051/medsci/200824165>
- Miller, L.P., Dowd, W.W., 2017. Multimodal *in situ* datalogging quantifies inter-individual variation in thermal experience and persistent origin effects on gaping behavior among intertidal mussels (*Mytilus californianus*). *The Journal of Experimental Biology* 220, 4305–4319. <https://doi.org/10.1242/jeb.164020>
- Miserazzi, A., Sow, M., Gelber, C., Charifi, M., Ciret, P., Dalens, J.M., Weber, C., Le Floch, S., Lacroix, C., Blanc, P., Massabuau, J.C., 2020a. Asiatic clam *Corbicula fluminea* exhibits distinguishable behavioural responses to crude oil under semi-natural multiple stress conditions. *Aquatic Toxicology* 219, 105381. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105381>
- Miserazzi, A., Perrigault, M., Sow, M., Gelber, C., Ciret, P., Lomenech, A.M., Dalens, J.M., Weber, C., Le Floch, S., Lacroix, C., Blanc, P., Massabuau, J.C., 2020b. Proteome changes in muscles, ganglia, and gills in *Corbicula fluminea* clams exposed to crude oil: Relationship

with behavioural disturbances. *Aquatic Toxicology* 223, 105482.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105482>

Mommsen, T.P., 1984. 7 Metabolism of the Fish Gill, in: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology, Gills*. Academic Press, pp. 203–238. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60186-7](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60186-7)

Nagy, A.S., Simon, G., Szabó, J., Vass, I., 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface water and bed sediments of the Hungarian upper section of the Danube River. *Environ Monit Assess* 185, 4619–4631. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2892-6>

Nahrgang, J., Brooks, S.J., Evenset, A., Camus, L., Jonsson, M., Smith, T.J., Lukina, J., Frantzen, M., Giarratano, E., Renaud, P.E., 2013. Seasonal variation in biomarkers in blue mussel (*Mytilus edulis*), Icelandic scallop (*Chlamys islandica*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*)—Implications for environmental monitoring in the Barents Sea. *Aquatic Toxicology, Environmental Variations and Toxicological Responses* 127, 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.01.009>

Neff, J. M. 1990. Composition and fate of petroleum and spill-treating agents in the marine environment. Pages 1-33 In: J. R. Geraci and D. J. St. Aubin, Eds., *Sea Mammals and Oil: Confronting the Risks*. Academic Press, San Diego.

Neff, J., Lee, K., DeBlois, E.M., 2011. Produced Water: Overview of Composition, Fates, and Effects, in: Lee, K., Neff, J. (Eds.), *Produced Water: Environmental Risks and Advances in Mitigation Technologies*. Springer New York, New York, NY, pp. 3–54. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0046-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0046-2_1)

Neff, J.M., 2002. *Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of Contaminants from Oil Well Produced Water*. Elsevier.

Neff, J.M., Cox, B.A., Dixit, D., Anderson, J.W., 1976. Accumulation and release of petroleum-derived aromatic hydrocarbons by four species of marine animals. *Mar. Biol.* 38, 279–289. <https://doi.org/10.1007/BF00388940>

NOAA, 1998. National Oceanic and Atmospheric Administration, Rhode Island Department of Environmental Protection, and U.S. Department of the Interior. 1998. Damage assessment and restoration plan for the North Cape Oil Spill. NOAA Damage Assessment Center, Silver Spring, MD.

Nöges, P., Argillier, C., Borja, Á., Garmendia, J.M., Hanganu, J., Kodeš, V., Pletterbauer, F., Sagouis, A., Birk, S., 2016. Quantified biotic and abiotic responses to multiple stress in freshwater, marine and ground waters. *Science of The Total Environment, 5th Special Issue SCARCE: River Conservation under Multiple stressors: Integration of ecological status, pollution and hydrological variability* 540, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.045>

- NRC, 1985. Council, N.R., 1985. Committee on Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects, Ocean Studies Board, Marine Board, Transportation Research Board, Division on Earth and Life Studies, National Research Council, 1985. Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects. <https://doi.org/10.17226/314>
- NRC, 2003. Committee on Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects, Ocean Studies Board, Marine Board, Transportation Research Board, Division on Earth and Life Studies, National Research Council, 2003. Oil in the Sea III: Inputs, Fates, and Effects. National Academies Press, Washington, D.C. <https://doi.org/10.17226/10388>
- O'Connor, T., 2002. National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. *Marine environmental research* 53, 117–43. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(01\)00116-7](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(01)00116-7)
- OSPAR Convention, 1992. Convention for the protection of the marine environment of the north-east Atlantic. Paris, 21-22 septembre 1992
- Palmork, K.H., Solbakken, J.E., 1981. Distribution and elimination of [9-14C]phenanthrene in the horse mussel (*Modiola modiolus*). *Bull Environ Contam Toxicol* 26, 196–201. <https://doi.org/10.1007/bf01622075>
- Parker, M.O., 2016. Adult vertebrate behavioural aquatic toxicology: Reliability and validity. *Aquatic Toxicology* 170, 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.001>
- Pasparakis, C., Esbaugh, A.J., Burggren, W., Grosell, M., 2019. Physiological impacts of Deepwater Horizon oil on fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 224, 108558. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.06.002>
- Peng, C., Zhao, X., Liu, S., Shi, W., Han, Y., Guo, C., Jiang, J., Wan, H., Shen, T., Liu, G., 2016. Effects of anthropogenic sound on digging behavior, metabolism, Ca(2+)/Mg(2+) ATPase activity, and metabolism-related gene expression of the bivalve *Sinonovacula constricta*. *Sci Rep* 6, 24266. <https://doi.org/10.1038/srep24266>
- Piazza, R.S., Trevisan, R., Flores-Nunes, F., Toledo-Silva, G., Wendt, N., Mattos, J.J., Lima, D., Taniguchi, S., Sasaki, S.T., Mello, Á.C.P., Zacchi, F.L., Serrano, M.A.S., Gomes, C.H.A.M., Bicego, M.C., Almeida, E.A. de, Bainy, A.C.D., 2016. Exposure to phenanthrene and depuration: Changes on gene transcription, enzymatic activity and lipid peroxidation in gill of scallops *Nodipecten nodosus*. *Aquat. Toxicol.* 177, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.05.025>
- Pierron, F., Baudrimont, M., Boudou, A., Massabuau, J.-C., 2007. Effects of salinity and hypoxia on cadmium bioaccumulation in the shrimp *Palaemon longirostris*. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1010–1017.

- Piggott, J.J., Townsend, C.R., Matthaei, C.D., 2015. Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors. *Ecol Evol* 5, 1538–1547. <https://doi.org/10.1002/ece3.1465>
- Porte, C., Albaigés, J., 1994. Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustaceans, and fishes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26, 273–281. <https://doi.org/10.1007/BF00203552>
- Pruell, R.J., Lake, J.L., Davis, W.R., Quinn, J.G., 1986. Uptake and depuration of organic contaminants by blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to environmentally contaminated sediment. *Marine Biology* 91, 497–507. <https://doi.org/10.1007/BF00392601>
- Pyle, G., Ford, A.T., 2017. Behaviour revised: Contaminant effects on aquatic animal behaviour. *Aquatic Toxicology* 182, 226–228. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.11.008>
- Rainio, K., Linko, R.R., Ruotsila, L., 1986. Polycyclic aromatic hydrocarbons in mussel and fish from the finnish Archipelago Sea. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 337–343. <https://doi.org/10.1007/BF01607770>
- Ramachandran, S.D., Swezey, M.J., Hodson, P.V., Boudreau, M., Courtenay, S.C., Lee, K., King, T., Dixon, J.A., 2006. Influence of salinity and fish species on PAH uptake from dispersed crude oil. *Marine Pollution Bulletin* 52, 1182–1189. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.02.009>
- Rank, J., 2009. Intersex in *Littorina littorea* and DNA damage in *Mytilus edulis* as indicators of harbour pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1271–1277. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.12.008>
- Redmond, K.J., Berry, M., Pampanin, D.M., Andersen, O.K., 2017. Valve gape behaviour of mussels (*Mytilus edulis*) exposed to dispersed crude oil as an environmental monitoring endpoint. *Marine Pollution Bulletin* 117, 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.02.005>
- Rewitz, K.F., Kjellerup, C., Jørgensen, A., Petersen, C., Andersen, O., 2004. Identification of two *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) cytochromes P450 and induction by xenobiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 138, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.05.007>
- Rinaldi, G., Rossi, M., Fendt, S.-M., 2018. Metabolic interactions in cancer: cellular metabolism at the interface between the microenvironment, the cancer cell phenotype and the epigenetic landscape. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 10. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1397>
- Roberts, L., Cheesman, S., Breithaupt, T., Elliott, M., 2015. Sensitivity of the mussel *Mytilus edulis* to substrate-borne vibration in relation to anthropogenically generated noise. *Marine Ecology Progress Series* 538, 185–195. <https://doi.org/10.3354/meps11468>



- Rossi, S.S., Thomas, W.H., 1981. Solubility behavior of three aromatic hydrocarbons in distilled water and natural seawater. *Environ. Sci. Technol.* 15, 715–716. <https://doi.org/10.1021/es00088a013>
- Rossi-Santos, M.R., 2015. Oil industry and noise pollution in the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) soundscape ecology of the Southwestern Atlantic breeding ground. *Journal of Coastal Research* 31, 184–195. <https://doi.org/10.2112/JCOASTRES-D-13-00195.1>
- Ryerson, T.B., Aikin, K.C., Angevine, W.M., Atlas, E.L., Blake, D.R., Brock, C.A., Fehsenfeld, F.C., Gao, R.-S., Gouw, J.A. de, Fahey, D.W., Holloway, J.S., Lack, D.A., Lueb, R.A., Meinardi, S., Middlebrook, A.M., Murphy, D.M., Neuman, J.A., Nowak, J.B., Parrish, D.D., Peischl, J., Perring, A.E., Pollack, I.B., Ravishankara, A.R., Roberts, J.M., Schwarz, J.P., Spackman, J.R., Stark, H., Warneke, C., Watts, L.A., 2011. Atmospheric emissions from the Deepwater Horizon spill constrain air-water partitioning, hydrocarbon fate, and leak rate. *Geophysical Research Letters* 38. <https://doi.org/10.1029/2011GL046726>
- Salazar-Coria, L., Rocha-Gómez, M.A., Matadamas-Martínez, F., Yépez-Mulia, L., Vega-López, A., 2019. Proteomic analysis of oxidized proteins in the brain and liver of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a water-accommodated fraction of Maya crude oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 171, 609–620. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.033>
- Salvi, D., Macali, A., Mariottini, P., 2014. Molecular Phylogenetics and Systematics of the Bivalve Family Ostreidae Based on rRNA Sequence-Structure Models and Multilocus Species Tree. *PLoS ONE* 9, e108696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108696>
- Salvi, D., Mariottini, P., 2017. Molecular taxonomy in 2D: a novel ITS2 rRNA sequence-structure approach guides the description of the oysters' subfamily Saccostreinae and the genus *Magallana* (Bivalvia: Ostreidae). *Zool J Linn Soc* 179, 263–276. <https://doi.org/10.1111/zoj.12455>
- Sammarco, P.W., Kolian, S.R., Warby, R.A.F., Bouldin, J.L., Subra, W.A., Porter, S.A., 2013. Distribution and concentrations of petroleum hydrocarbons associated with the BP/Deepwater Horizon Oil Spill, Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin* 73, 129–143. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.05.029>
- Santana, M.S., Sandrini-Neto, L., Filipak Neto, F., Oliveira Ribeiro, C.A., Di Domenico, M., Prodocimo, M.M., 2018. Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis. *Environmental Pollution* 242, 449–461. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.004>
- Sarria-Villa, R., Ocampo-Duque, W., Páez, M., Schuhmacher, M., 2016. Presence of PAHs in water and sediments of the Colombian Cauca River during heavy rain episodes, and implications for risk assessment. *Science of The Total Environment*, 5th Special Issue SCARCE: River Conservation under Multiple stressors: Integration of ecological status,

pollution and hydrological variability 540, 455–465.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.020>

Schinkel, A.H., Smit, J.J., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., te Riele, H.P., 1994. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77, 491–502. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90212-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90212-7)

Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E., George, S., James, M., Kullman, S., Van den Hurk, P., Willett, K., 2008. Biotransformation in Fishes, in: *The Toxicology of Fishes*. pp. 153–234. <https://doi.org/10.1201/9780203647295.ch4>

Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68, 369–392. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.016>

Selye, H., 1946. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 6, 117–230. <https://doi.org/10.1210/jcem-6-2-117>

Selye, H., 1950. Stress and the General Adaptation Syndrome. *Br Med J* 1, 1383–1392.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>

Shi, W., Han, Y., Guan, X., Rong, J., Du, X., Zha, S., Tang, Y., Liu, G., 2019. Anthropogenic Noise Aggravates the Toxicity of Cadmium on Some Physiological Characteristics of the Blood Clam *Tegillarca granosa*. *Frontiers in Physiology* 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00377>

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, 21. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>

Shukla, P., Gopalani, M., Ramteke, D.S., Wate, S.R., 2007. Influence of Salinity on PAH Uptake from Water Soluble Fraction of Crude Oil in *Tilapia mossambica*. *Bull Environ Contam Toxicol* 79, 601–605. <https://doi.org/10.1007/s00128-007-9272-x>

Sleigh, J.N., Rossor, A.M., Fellows, A.D., Tosolini, A.P., Schiavo, G., 2019. Axonal transport and neurological disease. *Nat Rev Neurol* 15, 691–703. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0257-2>

- Sokolova, I.M., 2013. Energy-Limited Tolerance to Stress as a Conceptual Framework to Integrate the Effects of Multiple Stressors. *Integrative and Comparative Biology* 53, 597–608. <https://doi.org/10.1093/icb/ict028>
- Solan, M., Hauton, C., Godbold, J.A., Wood, C.L., Leighton, T.G., White, P., 2016. Anthropogenic sources of underwater sound can modify how sediment-dwelling invertebrates mediate ecosystem properties. *Scientific Reports* 6. <https://doi.org/10.1038/srep20540>
- Sousa, J.C.G., Ribeiro, A.R., Barbosa, M.O., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T., 2018. A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *Journal of Hazardous Materials* 344, 146–162. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.058>
- 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. *Environmental Monitoring and Assessment* 182, 155–170. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1866-9>
- Spangenberg, J.V., Cherr, G.N., 1996. Developmental effects of barium exposure in a marine bivalve (*Mytilus californianus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 1769–1774. <https://doi.org/10.1002/etc.5620151018>
- Srinivasa Reddy, M., Basha, S., Joshi, H.V., Ramachandraiah, G., 2005. Seasonal distribution and contamination levels of total PHCs, PAHs and heavy metals in coastal waters of the Alang–Sosiya ship scrapping yard, Gulf of Cambay, India. *Chemosphere* 61, 1587–1593. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.04.093>
- Stagg, R.M., McIntosh, A., 1996. Hydrocarbon concentrations in the northern North Sea and effects on fish larvae. *Science of The Total Environment* 186, 189–201. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(96\)05111-X](https://doi.org/10.1016/0048-9697(96)05111-X)
- Stainken, D.M., 1976. The effect of a No. 2 fuel oil and a South Louisiana crude oil on the behavior of the soft shell clam, *Mya arenaria* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 16, 724–729. <https://doi.org/10.1007/BF01685580>
- Stegeman, J.J., Teal, J.M., 1973. Accumulation, release and retention of petroleum hydrocarbons by the oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biology* 22, 37–44. <https://doi.org/10.1007/BF00388908>
- Stock, D., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 1999. Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP Synthase. *Science* 286, 1700–1705. <https://doi.org/10.1126/science.286.5445.1700>
- Stout, S.A., Wang, Z., 2016. 3 - Chemical fingerprinting methods and factors affecting petroleum fingerprints in the environment, in: Stout, S.A., Wang, Z. (Eds.), *Standard Handbook Oil Spill Environmental Forensics (Second Edition)*. Academic Press, Boston, pp. 61–129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803832-1.00003-9>

- Stronkhorst, J., 1992. Trends in pollutants in blue mussel *Mytilus edulis* and flounder *Platichthys flesus* from two Dutch estuaries, 1985–1990. *Marine Pollution Bulletin* 24, 250–258. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(92\)90563-L](https://doi.org/10.1016/0025-326X(92)90563-L)
- Stronkhorst, J., Misdorp, R., Vos, P.C. 1994. Trace metals, PCBs, and PAHs in benthic (epipellic) diatoms from intertidal sediments; a pilot study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*; (United States) 52:6. <https://doi.org/10.1007/BF00200689>
- Sugawara, Y., 1964. Microscopical Studies of the Nervous System in Oysters. *Archivum histologicum japonicum* 24, 257–272. <https://doi.org/10.1679/aohc1950.24.257>
- Sun, J., Zheng, X., 2009. A review of oil-suspended particulate matter aggregation--a natural process of cleansing spilled oil in the aquatic environment. *J Environ Monit* 11, 1801–1809. <https://doi.org/10.1039/b904829b>
- Sun, X., Liu, Z., Wu, B., Zhou, L., Wang, Q., Wu, W., Yang, A., 2018. Differences between fast and slow muscles in scallops revealed through proteomics and transcriptomics. *BMC Genomics* 19, 377. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4770-2>
- Sverdrup, L.E., Nielsen, T., Krogh, P.H., 2002. Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2429–2435.
- Swedmark, M., Granmo, Å., Kollberg, S., 1973. Effects of oil dispersants and oil emulsions on marine animals. *Water Research* 7, 1649–1672. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(73\)90134-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(73)90134-6)
- Tierney, K.B., 2016. Chemical avoidance responses of fishes. *Aquatic Toxicology* 174, 228–241. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.021>
- Tissot, B.P., Welte, D.H., 1984. *Petroleum formation and occurrence*. 2<sup>nd</sup> ed. Springer-Verlag, Berlin; New York.
- Tomanek, L., 2011. Environmental Proteomics: Changes in the Proteome of Marine Organisms in Response to Environmental Stress, Pollutants, Infection, Symbiosis, and Development. *Annual Review of Marine Science* 3, 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142729>
- Tomanek, L., 2015. Proteomic responses to environmentally induced oxidative stress. *Journal of Experimental Biology* 218, 1867–1879. <https://doi.org/10.1242/jeb.116475>
- Tran, D., Boudou, A., Massabuau, J.-C., 2000. Mechanism for maintaining oxygen consumption under varying oxygenation levels in the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Can. J. Zool.* 78, 2027–2036. <https://doi.org/10.1139/z00-139>

- Tran, D., Boudou, A., Massabuau, J.-C., 2001. How water oxygenation level influences cadmium accumulation pattern in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: A laboratory and field study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2073–2080. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200929>
- Tran, D., Boudou, A., Massabuau, J.-C., 2002. Relationship between feeding-induced ventilatory activity and bioaccumulation of dissolved and algal-bound cadmium in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 327–333. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210214>
- 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. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 2278–2284. <https://doi.org/10.1897/05-016R.1>
- 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. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 2278–2284. <https://doi.org/10.1897/05-016R.1>
- 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* 22, 914–920. <https://doi.org/10.1002/etc.5620220432>
- Tran, D., Fournier, E., Durrieu, G., Massabuau, J.-C., 2007. Inorganic mercury detection by valve closure response in the freshwater clam *Corbicula fluminea*: integration of time and water metal concentration changes. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 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, 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.10.030>
- Trefry, J.H., Naito, K.L., Trocine, R.P., Metz, S., 1995. Distribution and bioaccumulation of heavy metals from produced water discharges to the gulf of mexico. *Water Science and Technology* 32, 31–36. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00566-6](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00566-6)
- Tyanova, S., Cox, J., 2018. Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of Proteomics Data in Cancer Research, in: von Stechow, L. (Ed.), *Cancer Systems Biology: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 133–148. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7493-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7493-1_7)

- Uthe, J.F., Musial, C.J., 1986. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination of American lobster, *Homarus americanus*, in the proximity of a coal-coking plant. *Bull Environ Contam Toxicol* 37, 730–738. <https://doi.org/10.1007/bf01607832>
- Van Aggelen, G., Ankley, G.T., Baldwin, W.S., Bearden, D.W., Benson, W.H., Chipman, J.K., Collette, T.W., Craft, J.A., Denslow, N.D., Embry, M.R., Falciani, F., George, S.G., Helbing, C.C., Hoekstra, P.F., Iguchi, T., Kagami, Y., Katsiadaki, I., Kille, P., Liu, L., Lord, P.G., McIntyre, T., O'Neill, A., Osachoff, H., Perkins, E.J., Santos, E.M., Skirrow, R.C., Snape, J.R., Tyler, C.R., Versteeg, D., Viant, M.R., Volz, D.C., Williams, T.D., Yu, L., 2010. Integrating Omic Technologies into Aquatic Ecological Risk Assessment and Environmental Monitoring: Hurdles, Achievements, and Future Outlook. *Environmental Health Perspectives* 118, 1–5. <https://doi.org/10.1289/ehp.0900985>
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Van Haren, R.J.F., Schepers, H.E., Kooijman, S.A.L.M., 1994. Dynamic energy budgets affect kinetics of xenobiotics in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Chemosphere* 29, 163–189. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(94\)90099-X](https://doi.org/10.1016/0045-6535(94)90099-X)
- Van Wezel, A.P., Opperhuizen, A., 1995. Narcosis due to environmental pollutants in aquatic organisms: residue-based toxicity, mechanisms, and membrane burdens. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 255–279. <https://doi.org/10.3109/10408449509089890>
- Varanasi, Usha., Reichert, W.L., Stein, J.E., Brown, D.W., Sanborn, H.R., 1985. Bioavailability and biotransformation of aromatic hydrocarbons in benthic organisms exposed to sediment from an urban estuary. *Environ. Sci. Technol.* 19, 836–841. <https://doi.org/10.1021/es00139a012>
- Vazzana, M., Celi, M., Maricchiolo, G., Genovese, L., Corrias, V., Quinci, E.M., de Vincenzi, G., Maccarrone, V., Cammilleri, G., Mazzola, S., Buscaino, G., Filiciotto, F., 2016. Are mussels able to distinguish underwater sounds? Assessment of the reactions of *Mytilus galloprovincialis* after exposure to lab-generated acoustic signals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 201, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.029>
- Veil, J.A. 2006. Comparison of two International Approaches to controlling risk from produced water discharges. Paper presented at the 70th PERF Meeting, Paris, France, March 21-22, 2006.
- Veith, G.D., Call, D.J., Brooke, L.T., 1983. Structure–Toxicity Relationships for the Fathead Minnow, *Pimephales promelas*: Narcotic Industrial Chemicals. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40, 743–748. <https://doi.org/10.1139/f83-096>

- Wade, T.L., Kennicutt, M.C., Brooks, J.M., 1989. Gulf of Mexico hydrocarbon seep communities: Part III. aromatic hydrocarbon concentrations in organisms, sediments and water. *Marine Environmental Research* 27, 19–30. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(89\)90016-0](https://doi.org/10.1016/0141-1136(89)90016-0)
- Wang, Z., Fingas, M., 1996. Separation and Characterization of Petroleum Hydrocarbons and Surfactant in Orimulsion Dispersion Samples. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3351–3361. <https://doi.org/10.1021/es960248h>
- Wang, Z., Hollebone, B. P., Fingas, M., Fieldhouse, B., Sigouin, L., Landriault, M., Smith, P., Noonan, J., Thouin, G., Weaver, J-W., 2003. Characteristics of spilled oils, fuels, and petroleum products: 1. Composition and properties of selected oils. US EPA Report EPA/600-R/03, 72.
- Webster, L., Russell, M., Packer, G., Moffat, C.F., 2006. Long term monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in blue mussels (*Mytilus edulis*) from a remote Scottish location. *Polycyclic Aromatic Compounds* 26, 283–298. <https://doi.org/10.1080/10406630600904109>
- Weiss, B., 1994. *Neurobehavioral Toxicity: Analysis and Interpretation*. CRC Press.
- Whitehead, A., 2013. Interactions between Oil-Spill Pollutants and Natural Stressors Can Compound Ecotoxicological Effects. *Integrative and Comparative Biology* 53, 635–647. <https://doi.org/10.1093/icb/ict080>
- Widdows, J., Donkin, P., Evans, S.V., 1987. Physiological responses of *Mytilus edulis* during chronic oil exposure and recovery. *Marine Environmental Research* 23, 15–32. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(87\)90014-6](https://doi.org/10.1016/0141-1136(87)90014-6)
- Xu, E.G., Khursigara, A.J., Magnuson, J., Hazard, E.S., Hardiman, G., Esbaugh, A.J., Roberts, A.P., Schlenk, D., 2017. Larval Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) Sublethal Exposure to Weathered Deepwater Horizon Crude Oil: Developmental and Transcriptomic Consequences. *Environ. Sci. Technol.* 51, 10162–10172. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02037>
- Xu, E.G., Mager, E.M., Grosell, M., Pasparakis, C., Schlenker, L.S., Stieglitz, J.D., Benetti, D., Hazard, E.S., Courtney, S.M., Diamante, G., Freitas, J., Hardiman, G., Schlenk, D., 2016. Time- and Oil-Dependent Transcriptomic and Physiological Responses to Deepwater Horizon Oil in Mahi-Mahi (*Coryphaena hippurus*) Embryos and Larvae. *Environ. Sci. Technol.* 50, 7842–7851. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02205>
- Yogev, S., Cooper, R., Fetter, R., Horowitz, M., Shen, K., 2016. Microtubule Organization Determines Axonal Transport Dynamics. *Neuron* 92, 449–460. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.036>

- Zhang, D., Wang, J.-J., Ni, H.-G., Zeng, H., 2017. Spatial-temporal and multi-media variations of polycyclic aromatic hydrocarbons in a highly urbanized river from South China. *Science of The Total Environment* 581–582, 621–628. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.171>
- Zhang, Y., Fonslow, B.R., Shan, B., Baek, M.-C., Yates, J.R., 2013. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chem. Rev.* 113, 2343–2394. <https://doi.org/10.1021/cr3003533>
- Zheng, J., Chen, B., Thanyamanta, W., Hawboldt, K., Zhang, B., Liu, B., 2016. Offshore produced water management: A review of current practice and challenges in harsh/Arctic environments. *Marine Pollution Bulletin* 104, 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.004>
- Zimmermann, H., 2008. ATP and acetylcholine, equal brethren. *Neurochemistry International* 52, 634–648. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.09.004>