



HAL
open science

Etude des réponses de la moule *Mytilus* spp exposée à des stress métallique et thermique durant les stades embryo-larvaires

Khouloud Boukadida Ammar

► **To cite this version:**

Khouloud Boukadida Ammar. Etude des réponses de la moule *Mytilus* spp exposée à des stress métallique et thermique durant les stades embryo-larvaires. Milieux et Changements globaux. Université de Bordeaux; Université de Monastir (Tunisie), 2017. Français. NNT : 2017BORD0571 . tel-01806326

HAL Id: tel-01806326

<https://theses.hal.science/tel-01806326>

Submitted on 2 Jun 2018

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.

Université de Monastir
Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir
Ecole Doctorale Sciences Biologiques, Biotechnologiques et Santé

En cotutelle avec

Université de Bordeaux
Ecole Doctorale Sciences et Environnements

Thèse présentée pour obtenir le titre de
DOCTEUR en

Sciences Biologiques et Biotechnologie
Et
Géochimie et Écotoxicologie

Par : Mme. BOUKADIDA AMMAR Khouloud

**Etude des réponses de la moule *Mytilus*
spp exposée à des stress métallique et
thermique durant les stades
embryo-larvaires.**

Soutenue publiquement le 10/04/2017 devant un jury composé de :

<i>Présidente</i>	Mme. SAIDANE MOSBAHI Dalila	Université de Monastir, FP
<i>Rapporteurs</i>	M. AUFFRET Michel	Université de Bretagne Occidentale
	Mme. TRIGUI EL MENIF Najoua	Université de Carthage, FSB
<i>Examineur</i>	Mme. COSTIL Katherine	Université de Caen Normandie
<i>Co-directeurs de thèse</i>	M. CACHOT Jérôme	Université de Bordeaux
	M. BANNI Mohamed	Université de Monastir, ISBM



Laboratoires d'accueil : UMR CNRS 5805 EPOC
Equipe Ecotoxicologie Aquatique
OASU - Université de Bordeaux
Allée Geoffroy Saint-Hilaire
CS 50023 - 33615 PESSAC CEDEX - FRANCE

Tél : +33 0 00 00 00 00
Fax : 0 (33) 5 40 00 33 16
Web : <http://www.epoc.u-bordeaux.fr/>

Et

Laboratoire de Biochimie et de Toxicologie de l'environnement
Institut Supérieur Agronomique de Chott-Mariem
BP 47, 4042 Chott Mériem - Sousse

Tél. 00 216 73 327 544
Fax : 00 216 73 327 591
Web : <http://www.isa-cm.agrinet.tn/>

Sous la co-direction de : Directeur 1 Jérôme CACHOT
jerome.cachot@u-bordeaux.fr
Directeur 2 Pr. Mohamed BANNI
m_banni@yahoo.fr

Financement : Bourse d'étude : EU-Metalic II -Erasmus Mundus

Ce projet de thèse était inclus dans le LABEX COTE cluster of excellence.

Résumé

Les écosystèmes marins côtiers sont soumis à des pressions anthropiques et naturelles qui placent les organismes aquatiques dans des situations de multi-stress. Ce travail doctoral avait pour objectif d'évaluer l'impact et de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation des premiers stades de vie de moule exposés à deux facteurs environnementaux majeurs : la pollution métallique et l'accroissement des températures des eaux marines côtières. Les effets induits par l'exposition à deux polluants métalliques modèles (Cu et Ag) et à un stress thermique modéré seuls ou en combinaison ont été évalués sur les stades précoces de développement de deux espèces de moule : *Mytilus galloprovincialis* et *Mytilus edulis* ainsi que leurs hybrides. Nos résultats montrent une augmentation significative du pourcentage de larves D malformées avec l'augmentation de la température. Par ailleurs, l'Ag apparaît significativement plus toxique que le Cu pour les larves. De plus, la toxicité des métaux s'accroît avec l'augmentation de la température. La co-exposition aux métaux et à une température modérée augmente les activités enzymatiques antioxydantes de la catalase (CAT), de la superoxyde dismutase (SOD) et de la glutathion-S-transférase (GST) et accroît le contenu cellulaire en métallothionéines et la peroxydation lipidique. A une température plus élevée de 22 °C, une diminution significative des activités des enzymes antioxydantes est observée. Les dommages à l'ADN chez les larves-D de moule *M. galloprovincialis* ont été évalués à l'aide du test des comètes avec et sans traitement par la Formamido-pyrimidine ADN glycosylase. L'exposition aux métaux et/ou à la température a augmenté de manière significative les lésions de l'ADN sur les larves de moule, avec un effet plus accentué sur les dommages oxydatifs. Il a été montré également que le Cu et l'Ag sont accumulés différenciellement dans les larves en fonction de la température d'exposition. L'étude de l'expression par RT-qPCR de 18 gènes impliqués dans les défenses antioxydantes, la réparation de l'ADN, l'apoptose, la protéolyse, la transcription, les réponses au stress thermique et la détoxification métallique a été conduite chez les larves-D de moule *M. galloprovincialis*. En cas d'un stress thermique modéré, une tendance à la surexpression des gènes impliqués dans les défenses cellulaires est observée. Toutefois, en cas d'une co-exposition métallique et thermique, les voies d'apoptose et d'altération cellulaires

sont activées. Un plugin et une macro ont été développés pour le logiciel ImageJ afin d'évaluer et de caractériser le comportement de nage des larves D de *M. galloprovincialis*. Une augmentation significative de la vitesse maximale des larves-D avec l'augmentation de la température est observée sans que la vitesse moyenne soit affectée. En revanche, l'exposition au Cu et à l'Ag à 22 °C augmente significativement les vitesses moyenne et maximale des larves. En condition contrôle à 18 °C, les larves suivent principalement des trajectoires rectilignes (88 %). Avec l'augmentation de la température et/ou l'exposition aux métaux, les trajectoires circulaires augmentent considérablement au détriment des trajectoires rectilignes. Ces modifications de comportement pourraient être liées d'une part à l'induction de malformations mais aussi à la modulation de l'activité neuronale. Ainsi, une augmentation significative de l'activité acétylcholine estérase (AChE) des larves a été observée suite à l'exposition à un gradient de températures et/ou aux métaux. Des larves D viables et normalement développées ont été obtenues par hybridation de *M. galloprovincialis* et *M. edulis*. Les larves de *M. edulis* apparaissent plus sensibles à la température que les larves de *M. galloprovincialis*. Aucune différence significative de sensibilité n'a été observée entre les moules hybrides et pures quel que soit le métal testé. En revanche, les larves hybrides issues d'une femelle de *M. galloprovincialis* sont plus tolérantes à l'augmentation de température par rapport aux hybrides issus d'une femelle de *M. edulis*.

Mots clés : Réchauffement climatique, Pollution métallique, Multi-stress, Stades embryon-larvaire, *Mytilus spp*, hybridation.

Abstract

Coastal marine ecosystems are subject to anthropogenic and natural pressures that place aquatic organisms in multi-stress situations. The aim of this doctoral work was to assess the impact and better understand the adaptation mechanisms of mussel early life stages exposed to two major environmental factors : metallic pollution and increasing temperatures in coastal marine waters. The effects induced by exposure to two model metal pollutants (Cu and Ag) and moderate thermal stress alone or in combination were evaluated on the early life stages of development of two mussel species : *Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus edulis* as well as their hybrids. Our results show a significant increase in the percentage of malformed D-larvae with increasing temperature. Moreover, Ag is significantly more toxic than Cu for larvae. In addition, the toxicity of metals increases with increasing temperature. Co-exposure to metals and a moderate temperature increases the antioxidant activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione-S-transferase (GST), and increases cellular content of metallothioneins and lipid peroxidation. At a higher temperature of 22 °C, a significant decrease in the activities of the antioxidant enzymes is observed. DNA damage in *M. galloprovincialis* larvae was evaluated using the comet assay with and without Formamidopyrimidine DNA glycosylase treatment. Co-exposure to metals and/or temperature increase significantly increased DNA lesions on mussel larvae, with a more pronounced effect on oxidative damage. It has also been shown that Cu and Ag are accumulated differently in the larvae as a function of the exposure temperature. The study of the gene expression by RT-qPCR of 18 genes involved in antioxidant defenses, DNA repair, apoptosis, proteolysis, transcription, thermal stress and metal detoxification was conducted in D-larvae of *M. galloprovincialis*. Under moderate thermal stress, a tendency of overexpression of the cell defense pathways is observed. However, in the case of metallic and thermal co-expositions, the pathways of apoptosis and cellular alteration are rather induced. A plugin and macro were developed for the evaluation and characterization of behavior of larvae of *M. galloprovincialis*. A significant increase in the maximum speed of D-larvae with increasing temperature is observed without affecting the mean velocity. In contrast, exposure to Cu and Ag at 22 °C significantly increases average and

maximum larval speed. Under controlled conditions at 18 °C, larvae mainly follow rectilinear trajectories (88 %). With increasing temperature and/or exposure to metals, circular trajectories increase considerably at the expense of rectilinear trajectories. These changes in behavior may be related to the induction of malformations but also to the modulation of neuronal activity. Thus, a significant increase in the acetylcholinesterase (AChE) activity of the larvae is observed following exposure to a temperature gradient and/or metals. Viable and normally developed D-larvae were obtained by hybridization of *M. galloprovincialis* and *M. edulis*. Larvae of *M. edulis* are more sensitive to temperature than larvae of *M. galloprovincialis*. No significant sensitivity differences between species are observed whatever the metal used. Moreover, the hybrid larvae from female *M. galloprovincialis* are more tolerant to the increase of temperature compared to the hybrid larvae issues from rom female of *M. edulis*.

Keywords : Global Warming, Metallic pollution, Multi-Stress, embryo-larval stages, *Mytilus spp*, hybridization.

Dédicaces

À mes chers parents Rachid et Dalila, pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien, leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer. Rien au monde ne pourrait compenser tout ce que vous avez fait pour moi. Vos prières, vos encouragements et votre soutien m'ont toujours été d'un grand secours. C'est à vous que je dois cette réussite et je suis fier de vous l'offrir. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés et le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu vous accorder santé, bonheur et longue vie.

À mon cher mari Mohamed Amine, pour ses sacrifices, son soutien moral et matériel, sa gentillesse sans égal, son profond attachement m'ont permis de réussir mes études. Sans son aide, ses conseils et ses encouragements ce travail n'aurait vu le jour.

À mes sœurs Khaoula et Khansa et mon frère Haythem, Je vous prie de trouver dans ce travail l'expression de mon estime et mon profond respect. Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu vous protège et vous garde.

À ma chère belle-mère Amina et mon beau-père Houssin, vous m'avez accueilli à bras ouverts dans votre famille. En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur et de santé.

À mes belles sœurs Imen, Inès, Islem et Sarah.

À toute ma famille proche et lointaine.

Remerciements

Au cours de la réalisation de ce projet de thèse de doctorat, plusieurs personnes m'ont beaucoup aidé, encouragé, soutenu...

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres du Jury qui ont accepté de juger ce travail : M. Michel AUFFRET Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale et Mme TRIGUI EL MENIF Najoua Professeur à l'Université de Carthage, Faculté de Sciences de Bizerte pour avoir accepté d'être rapporteurs. Je souhaite également remercier Mme. SAIDANE MOSBAHI Dalila Professeur à l'Université de Monastir, Faculté de Pharmacie pour avoir accepté d'être Présidente de jury. Merci également à Mme. COSTIL Katherine Maître de Conférences à l'Université de Caen Normandie pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examinatrice.

Un grand merci à mon directeur de thèse M. BANNI Mohamed, Professeur à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir (ISBM), de m'avoir encadré pendant ces trois ans de thèse. Tout a commencé en mastère quand il m'a donné le goût pour l'écotoxicologie, puis la thèse. La pleine confiance qu'il m'a accordée dès le début m'a permis de progresser régulièrement. Je voudrais aussi le remercier pour sa sympathie, sa bonne humeur et surtout pour le temps qu'il m'a consacré et la patience avec laquelle il a accompagné mon travail. Merci pour votre écoute, votre disponibilité et votre patience. Cette aventure à vos côtés était un réel plaisir. J'espère que le futur nous permettra de continuer à travailler ensemble.

Un grand merci également à mon directeur de thèse M. CACHOT Jérôme, Professeur à l'Université de Bordeaux, de m'avoir encadré pendant ces trois ans de thèse. Il a été d'un très grand soutien tout au long de mon travail de thèse. Toutes nos longues discussions sur les démarches expérimentales, les publications et la rédaction du manuscrit m'ont vraiment été très bénéfiques. Je tiens à lui remercier pour sa disponibilité et son aide pendant toutes les sorties terrains. Je tiens aussi à lui exprimer toute ma reconnaissance pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'intégrant dans son laboratoire et pour son soutien dans les moments difficiles et merci pour la confiance et l'autonomie qu'il m'a laissée dès le début de mon

travail. Une très belle aventure et j'espère que le futur nous permettra de continuer à travailler ensemble.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à M. Hamadi BOUSSETTA, Professeur de Biochimie et Directeur du Laboratoire de Biochimie et de Toxicologie de l'Environnement, d'avoir accepté de m'accueillir au sein de son équipe de recherche. Il m'a donné l'opportunité d'effectuer ce travail et m'a fait bénéficier de ses précieux conseils, son encadrement et ses encouragements. Qu'il trouve, en ce travail, l'expression de ma sincère gratitude et mon profond respect pour ses qualités humaines et scientifiques.

Tout a commencé depuis ma première année de master quand j'ai intégré une équipe formidable, l'équipe de Biochimie et de Toxicologie de l'Environnement qui est pour moi ma deuxième famille. Je remercie infiniment toute l'équipe pour leurs disponibilités et l'ambiance familiale qu'ils ont installée au sein du laboratoire. Une pensée particulière à mes deux copines Iteb et Sara, « mes collègues de lutte » pendant ces trois années de thèse. Je vous remercie pour les moments de folie, de soutien et tous les bons moments qu'on a partagé ensemble. Je tiens également à remercier toute l'équipe : Sana, Marouene, Iyed, Sonia, Rania, Nessrine, Oumaima, Fatma, Sondes.

L'opportunité de thèse en cotutelle m'a donné la chance de rencontrer des personnes formidables et une chaleureuse petite équipe d'écotoxicologie aquatique,

Un grand merci à Bénédicte qui m'a toujours accueilli avec son sourire charmant. Merci pour tes conseils, tes encouragements et les moments de partage scientifique, culturel et personnel.

Je tiens à remercier tout particulièrement Christelle, l'ange gardien du labo ! Tu as été toujours à l'écoute quand j'avais besoin, forte et disponible pour toutes les sorties de remplissage d'eau et de moules ! J'oublierai jamais combien de fois tu a été trompé d'eau en plein hiver pour me remplir les bidons ! Mille merci pour les ondes positives que tu m'envoyais à chaque fois j'ai des problèmes de manips.

Merci aussi à Blandine et Florane

Merci à Perrine pour son soutien dès mon arrivé au labo, tu étais toujours à l'écoute quel que soit ton humeur, grâce à toi j'ai appris comment manipuler des bébés huitres et moules ! Merci d'être toujours là pour m'apprendre des détails du « Vrai Français » que je connais pas avant, J'oublierai jamais qu'il faut dire quatre-vingt-un et non pas quatre-vingt et un !!!

La tendresse, la gentillesse, la douceur et plein d'autres belles expressions se résument tout simplement en Shannon, la fée Panaméenne que j'ai pu la rencontrer au cour de mon expérience de thèse. Merci ma belle pour ton sourire qui me charge d'énergie en plein dépression, merci pour les moments qu'on a partagé ensemble pendant ces trois ans.

Pauline, la flamme d'énergie du labo, merci pour les bons moments de partage et de soutien. Merci pour les petits astuces de la réussite d'une bonne crêpe! Tu m'a beaucoup appris sur la France et sur la Bretagne en particulier (Ta fierté!).

Merci également à mon ami Moulaye, le mauritanien optimiste. Je suis très contente de ta connaissance et des bons moments qu'on a partagé ensemble.

Une pensée particulière pour mes stagiaires, Jonathan et Abla qui m'ont marqué par leur gentillesse, leur dynamisme, leur aide sur ce travail mais surtout pour le partage que nous avons eu ensemble.

Merci également à tous ceux qui ont contribué aux analyses : Pierre-Yves Gourves et Alicia Romero Ramirez, à la Sepanso, et plus particulièrement à Dimitri, pour m'avoir ramené de l'eau pour les manip.

Je remercie infiniment ma copine Imen qui m'a formé sur Latex, grace à toi je suis très heureuse... Merci d'avoir été là quand j'avais besoin de toi. Que la vie te réserve tout le meilleur. Un grand merci aussi pour Mayada pour tout.

J'en oublie certainement et je vous prie de bien vouloir m'en excuser ...

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Dédicaces	v
Remerciements	vii
Table des matières	xi
Liste des publications, communications orales et posters	xix
Table des figures	xxi
Liste des tableaux	xxix
Introduction	1
1 Synthèse Bibliographique	5
1.1 Zones côtières	6
1.1.1 Productivité des zones côtières	8
1.1.2 Sensibilité des zones côtières aux forçages anthropiques et climatiques	8
1.2 Changement climatique	9
1.2.1 Réchauffement climatique	11
1.2.2 Effet du réchauffement climatique sur les zones côtières	11
1.2.3 Réponses écologiques induites par le changement climatique	13
1.3 Pollution métallique des zones côtières et lagunaires	15
1.3.1 Les éléments traces métalliques	16
1.3.2 Absorption et élimination des métaux	16

1.3.3	Métaux choisis pour l'étude	18
1.3.3.1	Métal essentiel : le Cuivre (Cu)	18
1.3.3.2	Métal toxique : l'Argent (Ag)	26
1.4	La Méditerranée : un milieu en danger dans un contexte de change- ment global	32
1.5	Modèle biologique : genre <i>Mytilus</i>	33
1.5.1	Reproduction :	35
1.5.1.1	Sexualité :	35
1.5.1.2	Gamétogenèse et cycle sexuel :	35
1.5.1.3	Émission des gamètes et fécondation :	36
1.5.1.4	Cycle de vie :	37
1.6	Contamination des mollusques bivalves	40
1.7	Mécanismes d'adaptation des bivalves face aux stress environne- mentaux	41
1.7.1	Notion de stress :	41
1.7.2	Les Bivalves et le stress :	41
1.7.3	Mécanismes d'adaptation :	42
1.8	Les tests embryo-larvaires de toxicité des bivalves :	43
1.8.1	Sensibilité des stades précoces de développement des inver- tébrés aquatiques :	44
1.8.2	Applications en écotoxicologie	45
1.9	Les biomarqueurs :	46
1.9.1	Transcriptomique :	46
1.9.2	Biochimique :	47
1.9.2.1	Défense contre les métaux : Les Métallothionéines (Mts) :	47
1.9.2.2	Défenses antioxydantes :	48
1.9.2.3	Protéines de stress :	50
1.9.2.4	Enzymes de phase II de biotransformation : la Glutathion- S-Transférases (GST)	50
1.9.2.5	Acétylcholinestérase (AChE)	51
1.9.3	Domages de l'ADN :	51
1.9.4	Comportement :	52
2	Problématique et objectifs	53
3	Bases méthodologiques	57
3.1	Démarche scientifique du projet de thèse	58
3.2	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	60
3.2.1	Test embryo-larvaire de toxicité	60
3.2.1.1	Eau de mer de référence	60

3.2.1.2	Préparation des solutions de contamination	61
3.2.1.3	Choc thermique et obtention des gamètes	62
3.2.1.4	Fécondation	64
3.2.1.5	Incubation	65
3.2.1.6	Analyse du développement larvaire	65
3.2.2	Dosage des métaux	69
3.2.2.1	Conservation des échantillons	69
3.2.2.2	Préparation des échantillons	69
3.2.2.3	Analyse des métaux	70
3.2.3	Étude Transcriptomique	72
3.2.3.1	Extraction des ARN totaux	72
3.2.3.2	Rétro-transcription des ARN	73
3.2.3.3	Conception des amorces	73
3.2.3.4	PCR quantitative en temps réel :	73
3.2.4	Dosage des Métallothionéines (Mts) par SDS-PAGE	74
3.2.4.1	Extraction des MTs	75
3.2.4.2	Migration sur gel SDS-PAGE	75
3.2.5	Étude Biochimique	76
3.2.5.1	Préparation de la fraction subcellulaire :	76
3.2.5.2	Dosage des protéines :	76
3.2.5.3	Dosage de l'activité Acétylcholinestérase (AChE)	77
3.2.5.4	Dosage de l'activité catalase :	77
3.2.5.5	Dosage de l'activité Glutathion-S-Transférase :	78
3.2.5.6	Dosage de l'activité Superoxyde dismutase (SOD) :	79
3.2.5.7	Mesure de la peroxydation lipidique	80
3.2.6	Évaluation de niveau d'altération de l'ADN : test des comètes	80
3.2.6.1	Dissociation cellulaire	81
3.2.6.2	Le test des comètes	81
3.2.6.3	Lecture des lames	82
3.2.7	Analyse du comportement natatoire des larves de la moule :	82
3.2.7.1	Acquisition vidéo pour analyse du comportement des larves de la moule	83
3.2.7.2	Conversion des vidéos pour analyse du comportement des larves de moule	84
3.2.7.3	Analyse de comportement des larves de moule par Image-J	84
3.3	Comparaison de la sensibilité des larves de 3 espèces de moule : <i>M. galloprovincialis</i> ; <i>M. edulis</i> et leurs hybrides aux stress thermique et métallique	85
3.4	Analyse statistique	85

Résultats et discussions	87
4 Étude de la sensibilité des stades embryo-larvaires de la moule méditerranéenne <i>Mytilus galloprovincialis</i> à la pollution métallique et à l'augmentation de la température	89
4.1 Introduction	90
4.2 Protocole expérimental	91
4.2.1 Produits chimiques utilisés et eau de mer	91
4.2.2 Analyses physique et chimique	92
4.2.3 Les essais de toxicité	92
4.2.4 l'analyse des données :	93
4.3 Résultats	94
4.3.1 Paramètres physico-chimiques	94
4.3.2 Effet de la température sur le développement embryo-larvaire de moule <i>Mytilus galloprovincialis</i>	94
4.3.3 Toxicité du cuivre ou de l'argent seul	97
4.3.4 Toxicité du mélange Cu-Ag	99
4.3.5 Influence de la température sur la toxicité des métaux	102
4.4 Discussion :	102
4.5 Conclusion	105
5 Étude du niveau du stress oxydatif chez les stades de vie précoces de <i>Mytilus galloprovincialis</i> exposés au cuivre, à l'argent et à un stress thermique modéré.	107
5.1 Introduction	108
5.2 Protocole expérimental	109
5.2.1 Conditions d'exposition	109
5.2.2 Analyses réalisées	110
5.2.3 Choix des gènes étudiés	110
5.2.4 Analyses statistiques	112
5.3 Résultats	113
5.3.1 Concentration en cuivre et en argent dans l'eau	113
5.3.2 Bioaccumulation du cuivre et de l'argent dans les larves	113
5.3.3 Effets des métaux et du stress thermique sur l'expression géniques des gènes étudiés	113
5.3.4 Effets des métaux et du stress thermique sur les enzymes antioxydantes	115
5.3.5 Effets des métaux et du stress thermique sur l'accumulation de MDA	116
5.3.6 Effets des métaux et du stress thermique sur le niveau des métallothionéines	116

5.3.7	Analyse de corrélation entres les variables étudiées	121
5.4	Discussion :	124
5.5	Conclusion	127
6	Analyse des effets seuls et combinés de la température, du cuivre et de l'argent sur le niveau d'altération de l'ADN chez les stades embryo-larvaire de la moule méditerranéenne <i>Mytilus galloprovincialis</i>	129
6.1	Introduction	130
6.2	Protocole expérimental	131
6.2.1	Conditions d'exposition	131
6.2.2	Choix des gènes étudiés	133
6.3	Traitement statistique	133
6.4	Résultats	134
6.4.1	Embryotoxicité	134
6.4.2	Domages à l'ADN : Génotoxicité	137
6.4.3	Altération du profil d'expression génique	143
6.4.4	Étude de corrélation entre les différents paramètres étudiés .	145
6.5	Discussion :	148
6.6	Conclusion :	153
7	Comportement natatoire et activité Acétylcholinestérase chez les stades embryo-larvaires de la moule méditerranéenne <i>Mytilus galloprovincialis</i> exposés au cuivre et/ou à l'argent à différentes températures.	155
7.1	Introduction :	156
7.2	Protocole expérimental :	157
7.3	Traitement statistique	158
7.4	Résultats	160
7.4.1	Étude de comportement natatoire des larves-D de la moule .	160
7.4.2	Suivi de la variation de l'activité enzymatique de l'Acétylcholinestérase (AChE)	170
7.4.3	Relation entre le comportement natatoire des larves de la moule et l'activité enzymatique de l'Acétylcholinestérase (AChE)	174
7.5	Discussion	176
7.6	Conclusion	179
8	Étude de l'hybridation entre <i>Mytilus edulis</i> et <i>Mytilus galloprovincialis</i> et évaluation des performances des larves des espèces pures et hybrides à différentes températures et à la contamination métallique	181
8.1	Introduction :	182

8.2	Protocole expérimental	184
8.2.1	Les géniteurs	184
8.2.2	Solutions de contamination	184
8.2.3	Choc thermique et obtention des gamètes	184
8.2.4	Fécondation	185
8.2.5	Incubation :	185
8.2.6	Analyse de développement larvaire	185
8.2.7	Analyses statistiques	186
8.3	Résultats :	186
8.3.1	Variabilité interindividuelle entre les différents couples de la même espèce	186
8.3.2	Comparaison de la sensibilité des larves hybrides et de la moule bleue <i>M. edulis</i> à l'augmentation de la température par rapport aux larves de la moule méditerranéenne <i>M. galloprovincialis</i>	191
8.3.3	Comparaison de la sensibilité des larves hybrides et de moule bleue <i>M. edulis</i> aux deux métaux (Cu, Ag) par rapport aux larves de la moule méditerranéenne <i>M. galloprovincialis</i>	195
8.3.4	Comparaison de la sensibilité des larves hybrides et de la moule bleue <i>M. edulis</i> à l'effet combiné de la température et des métaux par rapport aux larves de la moule méditerranéenne <i>M. galloprovincialis</i>	196
8.4	Discussion :	199
8.5	Conclusion :	203
9	Discussion générale	205
9.1	Sensibilité des stades précoces de développement de la moule <i>M. galloprovincialis</i> à la pollution métallique et au réchauffement des eaux	206
9.2	Larves de moule en multi-stress : Mécanismes de réponse aux stress chimique et thermique	212
9.3	Modifications adaptatives chez la moule <i>Mytilus spp</i> en réponse au réchauffement climatique	216
	Conclusions et perspectives	221

Annexes	225
Article 1 : High sensitivity of embryo-larval stage of the Mediterranean mussel, <i>Mytilus galloprovincialis</i> to metal pollution in combination with temperature increase	227
Article 2 : Early and efficient induction of antioxidant defense system in <i>Mytilus galloprovincialis</i> embryos exposed to metals and heat stress	237
Listes des 18 gènes étudiés ainsi que leurs couples d'amorces utilisées	247
Bibliographie	249
Bibliographie	249

Liste des publications, communications orales et posters

Articles dans des revues avec comité de lecture

1. Boukadida, K., et al. (2016), High sensitivity of embryo-larval stage of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* to metal pollution in combination with temperature increase, Marine Environmental Research.
2. Boukadida, K., et al. (2017), Early and efficient induction of antioxidant defense system in *Mytilus galloprovincialis* embryos exposed to metals and heat stress. Ecotoxicology and Environmental Safety journal.

Liste des communications dans un congrès international ou national

- BOUKADIDA Khouloud, BOUSSETTA Hamadi, BANNI Mohamed. 2014. Development of new sensitive biomarkers of exposure to cadmium based on gene expression regulation of Heat Shock Protein (HSP) variants. Internationals Symposium "Water Pollution and Environmental Impacts in the Mediterranean Basin" 24 -27 November 2014, Sousse (Tunisie). **Communication Orale**.
- Khouloud BOUKADIDA, Mohamed BANNI, Jérôme CACHOT. 2015. Effet combiné des polluants métalliques (Cu et Ag) et d'un stress thermique sur le développement précoce de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis*. Colloque 2015 de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA)- France (BORDEAUX)-30 Juin,1 Juillet 2015. **Communication Affichée**
- Khouloud BOUKADIDA, Mohamed BANNI, Jérôme CACHOT. 2016. Combined effect of metallic pollutants (Cu and Ag) and temperature on the early life stages of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. 26 th SETAC Europe annual meeting. 22-26 May 2016. Nantes (France). **Communication Affichée**
- Khouloud Boukadida, Jérôme Cachot, Christelle Clérandeau, Mohamed Banni. 2016. Caractérisation Biochimique et Transcriptomique du stress oxydatif

chez les premiers stades de développement de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* en situation de stress métallique et/ou thermique. ECOBIM 2016 - Université du Havre - 30 mai - 1er juin. Le havre (France).

Communication Orale.

- Khoulood Boukadida, Jérôme Cachot, Christelle Clérandeau, Pierre-Yves Gourves, Hamadi Boussetta, Mohamed Banni. 2016. Biochemical characterization and quantitative gene expression analysis of oxidative stress markers in *Mytilus galloprovincialis* early life stage exposed to metal contamination and heat stress. 30 th New European Society for Comparative Physiology and Biochemistry. September, 4 th - 7th Barcelona (Spain). **Communication Orale.**

Liste des communications lors de séminaires, journées scientifiques, journées des doctorants. . .

- Boukadida Khoulood., et al., Larve en multi-stress : adaptation ou extinction. Journée des doctorants : rentrée école doctorale 2015-2016. Bordeaux (France) **Communication Orale.**
- Boukadida Khoulood., et al., Évaluation du stress oxydatif chez les stades embryo-larvaires de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* en situation de multi-stress : approche Transcriptomique et Biochimique. JEST-11/12 Avril 2016, Arcachon (France) **Communication orale et Affichée**

Table des figures

1.1.1	Extension des zones côtières dans la définition du programme international LOICZ (LOICZ, 2005)	7
1.2.1	Augmentation des niveaux atmosphériques de dioxyde de carbone (CO_2) d'ici 2100 selon les modèles climatiques actuels du GIEC (IPCC, 2014)	10
1.2.2	Augmentation de la température des océans pendant les 3 dernières décennies (1850-2010) (www.lescrises.fr)	12
1.2.3	Changement global de la température moyenne de surface 2006-2100 tel que déterminé par des simulations multi-modèles. Les séries chronologiques des projections et une mesure d'incertitude (ombrage) sont indiqués pour les scénarios RCP2.6 (bleu) et RCP8.5 (rouge). (IPCC, 2014)	14
1.3.1	Modèle proposé des voies d'entrées du cuivre et de leur localisation intracellulaire (Minghetti et al., 2010)	19
1.3.2	Modèle proposé des voies d'entrées de l'argent et de leur localisation intracellulaire (Behra et al., 2013)	20
1.3.3	Comparaison des médianes des concentrations du cuivre dans les huîtres (carré bleu) et les moules (carré rouge) du littoral français : atlantique et méditerrané. Résultats du réseau de surveillance ROCCH pour la période 2003-2007	23
1.3.4	Les données de toxicité du cuivre exprimées en CE50 ou la CL50 chez un groupe d'organismes marins à différents stades de vie. (Adoptée par S.J. Brooks and M. Waldock, 2009 à partir des données de la base des données de l'US-EPA (United States Environmental Protection Agencies)	25

1.3.5	: Comparaison des médianes des concentrations de l'argent dans les huîtres (carré bleu) et les moules (carré rouge) du littoral français : atlantique et méditerrané. Résultats du réseau de surveillance ROCCH pour la période 2003-2007 (http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/parammaps/contaminants-chimiques/)	28
1.3.6	Corrélation de l'indice de gamète (de la maturité sexuelle) avec des concentrations d'argent dans les tissus de la palourde, <i>Corbula amurensis</i> . 9 ans d'échantillonnage mensuel sur quatre sites (Luoma, 2008)	29
1.5.1	Distributions mondiales approximatives de moules de genre <i>Mytilus</i> (Gaitán-Espitia et al., 2016) (modifié)	34
1.5.2	Cycle de vie de la moule <i>Mytilus spp.</i>	39
1.9.1	Les systèmes de défense anti-oxydante dans l'organisme. (Fernández-mejía, 2013).	49
3.2.1	: Carte de bassin d'Arcachon représentant le site de prélèvement de l'eau de mer de référence : le Banc d'Arguin.	61
3.2.2	(A) Bains de choc thermique, (B) isolement des moules qui commencent à frayer, (C) une moule femelle et (D) une moule mâle en cour d'émission de gamètes, (E) : vérification microscopique des ovules et (F) des spermatozoïdes.	63
3.2.3	Embryons de moule méditerranéenne au stade première division cellulaire ($\times 200$).	64
3.2.4	Présentation schématique des conditions d'exposition des larves utilisées pour les approches Chimique, Transcriptomique, Biochimique, Génotoxique et Comportemental. 4 L d'eau de mer filtrée et 500 000 embryons justes fécondés d'un seul couple par béccher.	68
3.2.5	Exemples de noyau d'ADN sans cassure (témoin) (A) et avec cassure (queue de la comète) (B).	83
4.3.1	Pourcentages (moyenne \pm écart-type) de larves D anormales <i>Mytilus galloprovincialis</i> exposées à différentes températures. Différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements ($N = 3$, $p < 0,05$, Kruskal-Wallis)	96
4.3.2	Pourcentages (moyennes \pm écart-type) des larves D anormales après exposition des embryons de <i>Mytilus galloprovincialis</i> à différentes concentrations de cuivre (Cu^{2+}) (A) ou d'argent (Ag^+) (B) et à différentes températures. ($N = 3$, $p < 0,05$, Kruskal-Wallis).	98

4.3.3 Pourcentages (moyennes \pm écart-type) de larves D anormales de *Mytilus galloprovincialis* exposées à différentes concentrations de mélanges de Cu-Ag à trois températures. Différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements (N = 3, $p < 0,05$, Kruskal-Wallis). 100

5.3.1 Les activités de la protéine CAT (A), SOD (B) et GST (C) dans les larves D de *Mytilus galloprovincialis* sont exposées pendant 48 h à Cu, Ag et leur mélange avec un gradient de température (18 ° C, 20 ° C et 22 ° C). Les données, exprimées en $\mu\text{mole} / \text{mn} / \text{mg}$ de protéines pour CAT et GST et SOD (n = 3), ont été analysées par ANOVA et le test post-hoc de Tukey. * : Différences statistiquement significatives ($p < 0,01$) par rapport au témoin (18 ° C sans apport de métal). a : Différences statistiquement significatives ($p < 0,01$) par rapport aux larves exposées à la même exposition aux métaux à 18 ° C. 118

5.3.2 Accumulation de MDA dans les larves D de *Mytilus galloprovincialis* exposées pendant 48 h au Cu, à l'Ag et leur mélange avec un gradient de températures (18 , 20 et 22 °C). Les valeurs (moyenne +/- ET) sont exprimées en nmole /mn/mg de protéines (n = 3). . 119

5.3.3 Variations des niveaux de métallothionéines (moy +/- ET) par rapport au témoin chez les larves-D de *Mytilus galloprovincialis* exposées pendant 48 h au Cu, à l'Ag et leur mélange et à un gradient de température (18, 20 et 22 °C). Les données (n = 4) ont été analysées par une ANOVA et le test post-hoc de Tukey. * : Différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) par rapport à la condition témoin (18 °C sans apport de métal). A : Différences statistiquement significatives ($p < 0,01$) par rapport aux larves exposées à la même concentration de métaux mais à 18 °C. 120

6.4.1 Pourcentages de malformation de larve D de moule *M. galloprovincialis* (moyenne \pm écart-type, N=3) suite à l'exposition à différentes températures. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre températures appliquées ($p < 0.05$, test post hoc de tukey). 134

6.4.2 Pourcentages de malformation de larve D de moule *M. galloprovincialis* (moyenne \pm écart-type, N=3) suite à l'exposition au cuivre et/ou à l'argent (B) à 18 °C. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les différentes conditions ($p < 0.05$, test post hoc de tukey). 135

6.4.3	Pourcentages de malformation de larve D de moule <i>M. galloprovincialis</i> (moyenne \pm écart-type, N=3) suite à l'exposition au cuivre (A), à l'argent (B) ou au mélange des deux métaux (C) et à différentes températures. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les températures appliquées pour ($p < 0.05$, test post hoc de tukey) pour un contaminant donné.	136
6.4.4	Évaluation par le test des comètes, sans fpg (bleu) et avec fpg (rouge), de l'effet de la température sur le niveau d'altération de l'ADN chez des larves trochophores de moules après exposition à 18, 20 et 22 °C durant leur développement embryonnaire.	138
6.4.5	Évaluation par test des comètes, sans fpg (bleu) et avec fpg (rouge), l'effet de Cu et/ou Ag sur le niveau d'altération de l'ADN chez des larves trochophores de moules après exposition à 18 °C durant leur développement embryonnaire.	139
6.4.6	Évaluation par le test des comètes, sans fpg (bleu) et avec fpg (rouge), de l'effet combiné de la température et de Cu et/ou Ag sur les dommages de l'ADN chez des larves trochophores de moules.	140
6.4.7	Relation entre le pourcentage de larves-D malformées et le pourcentage des cassures des brins d'ADN (A), les altérations oxydatives de l'ADN (B) et l'ensemble de ces deux dommages (C) suite à l'exposition au Cu et/ou à l'Ag et à différentes températures. . .	142
6.4.8	Les corrélations établies entre les niveaux d'altération de l'ADN et le niveau d'expression des 4 gènes étudiés après exposition à différentes températures, au cuivre et/ou l'argent. La case Génotoxicité représente l'ensemble des altérations d'ADN (cassures des brins d'ADN et altérations oxydatifs); la case alt.oxydatif représente l'altération oxydative de l'ADN.	146
6.4.9	Les corrélations établies entre l'embryotoxicité et le niveau d'expression des 4 gènes étudiés après exposition à différentes températures, au cuivre et/ou l'argent.	147
7.2.1	Exemple de résultat d'analyse par le logiciel Image-J des différentes trajectoires possibles effectuées par les larves-D de moules.	159
7.4.1	Figure 6.2 : Vitesse maximale (A) et vitesse moyenne (B) (mm/s) mesurées sur les larves-D de moules méditerranéennes, exposées à différentes températures (18, 20 et 22 °C). N = Nombres de larves étudiées, n= nombre de couples par condition. Les données sont exprimées en moyenne de couples (n) \pm Ecart Type. Des lettres différentes indiquant des différences significatives ($p < 0.05$, test post hoc de tukey) entres les différentes conditions.	162

7.4.2 Vitesse maximale (A) et vitesse moyenne (B) (mm/s) mesurées sur les larves-D de moules méditerranéennes, contrôle 18 °C et exposées au cuivre, l'argent et le mélange des deux métaux. N = Nombres de larves étudiées, n= nombre de couples par condition. Les données sont exprimées en moyenne de couples (n) ± Ecart Type. Des lettres différentes indiquant des différences significatives (p < 0.05, test post hoc de tukey) entres les différentes conditions. 163

7.4.3 Vitesse maximale (A) et vitesse moyenne (B) (mm/s) mesurées sur les larves-D de moules méditerranéennes, exposées à l'argent à différentes températures (18, 20 et 22 °C). N = Nombres de larves étudiées, n= nombre de couples par condition. Les données sont exprimées en moyenne de couples (n) ± Ecart Type. Des lettres différentes indiquant des différences significatives (p < 0.05, test post hoc de tukey) entres les différentes conditions. 164

7.4.4 Vitesse maximale (A) et vitesse moyenne (B) (mm/s) mesurées sur les larves-D de moules méditerranéennes, exposées à l'argent à différentes températures (18, 20 et 22 °C). N = Nombres de larves étudiées, n= nombre de couples par condition. Les données sont exprimées en moyenne de couples (n) ± Ecart Type. Des lettres différentes indiquant des différences significatives (p < 0.05, test post hoc de tukey) entres les différentes conditions. 165

7.4.5 Vitesse maximale (A) et vitesse moyenne (B) (mm/s) mesurées sur les larves-D de moules méditerranéennes, exposées au mélange Cu-Ag (Mix) à différentes températures (18, 20 et 22 °C). N = Nombres de larves étudiées, n= nombre de couples par condition. Les données sont exprimées en moyenne de couples (n) ± Ecart Type. Des lettres différentes indiquant des différences significatives (p < 0.05, test post hoc de tukey) entres les différentes conditions. 166

7.4.6 Trajectoires observées (Rectiligne, Circulaire et Surplace) des larves-D de moules méditerranéennes exposées à différentes températures. (Moyenne± Erreur Standard, N= nombre de vidéos exploitées pour un couple de géniteurs, p<0.05, test post hoc de tukey). 167

7.4.7 Trajectoires observées (Rectiligne, Circulaire et Surplace) des larves-D de moules méditerranéennes, contrôle à 18 °C et exposées au cuivre, à l'argent et au mélange des deux métaux. (Moyenne± Erreur Standard, N= nombre de vidéos exploitées pour un couple de géniteurs, p<0.05, test post hoc de tukey). 168

7.4.8 Trajectoires observées (Rectiligne, Circulaire et Surplace) des larves-D de moules méditerranéennes exposées au cuivre (A), à l'argent (B) et au mélange des deux (C) à différentes températures. (Moyenne \pm Erreur Standard, N= nombre de vidéos exploitées pour un couple de géniteurs, $p < 0.05$, test post hoc de tukey). 169

7.4.9 Variations de l'activité enzymatique AChE chez les larves de moule *Mytilus galloprovincialis* exposées pendant 48 h à un gradient croissant de température (18, 20 et 22 °C). Les données sont exprimées en moyenne \pm Ecart Type. Des lettres différentes indiquent des différences significatives (N=3; $p < 0,05$, test post hoc de tukey) entre les différentes conditions. 171

7.4.10 Variations de l'activité enzymatique AChE chez les larves de moule *Mytilus galloprovincialis* exposées pendant 48 h au cuivre et/ou l'argent à 18 °C. Les données sont exprimées en moyenne \pm Ecart Type. Des lettres différentes indiquent des différences significatives (N=3; $p < 0,05$, test post hoc de tukey) entre les différentes conditions. 172

7.4.11 Variations de l'activité enzymatique AChE chez les larves de moule *Mytilus galloprovincialis* exposées pendant 48 h au cuivre (A), à l'argent (B) et au mélange des deux (C) à un gradient croissant de température (18, 20 et 22 °C). Les données sont exprimées en moyenne \pm Ecart Type. Des lettres différentes indiquent des différences significatives (N=3; $p < 0,05$, test post hoc de tukey) entre les différentes conditions. 173

7.4.12 Matrice de corrélation (Pearson) entre l'activité AChE et les paramètres du comportement natatoire des larves de moules. 175

8.3.1 Comparaison de la variabilité inter-couples des pourcentages de larves-D malformées de *M. galloprovincialis* exposées pendant 48h à différentes conditions de température. L'axe Y secondaire indiquant le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves en anomalies de développement. 187

8.3.2 Comparaison de la variabilité inter-couples des pourcentages de larves-D malformées de *M. edulis* exposées pendant 48 h à différentes conditions de température. L'axe Y secondaire indiquant le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves en anomalies de développement. 188

8.3.3	Comparaison de la variabilité inter-couples des pourcentages de larves-D hybrides malformées (F. <i>Mytilus galloprovincialis</i> × <i>M. Mytilus edulis</i>) utilisées dans les différentes conditions de température. L'axe Y secondaire indiquant le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves en anomalies de développement.	189
8.3.4	Comparaison de la variabilité inter-couples des pourcentages de larves-D hybrides malformées (F. <i>Mytilus edulis</i> × <i>M. Mytilus galloprovincialis</i>) utilisées dans les différentes conditions de température. L'axe Y secondaire indiquant le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves en anomalies de développement.	190
8.3.5	Effet de l'incubation 48h à 18 °C sur le développement des larves-D de <i>M. galloprovincialis</i> , <i>M. edulis</i> et les hybrides des deux espèces. L'axe Y secondaire indique le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves malformées. Différentes lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$) entre les différents croisements. (Moyennes±écart type).	192
8.3.6	Effet de l'incubation 48 h à 20 °C sur le développement des larves-D de <i>M. galloprovincialis</i> , <i>M. edulis</i> et les hybrides des deux espèces. L'axe Y secondaire indique le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves malformées. Différentes lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$) entre les différents croisements. (Moyennes±écart type).	193
8.3.7	Effet de l'incubation 48 h à 22 °C sur le développement des larves-D de <i>M. galloprovincialis</i> , <i>M. edulis</i> et les hybrides des deux espèces. L'axe Y secondaire indique le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves malformées. Différentes lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$) entre les différents croisements. (Moyennes±écart type).	194
8.3.8	Effet de l'incubation 48h à 24 °C sur le développement des larves-D de <i>M. galloprovincialis</i> , <i>M. edulis</i> et les hybrides des deux espèces. L'axe Y secondaire indique le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves malformées. Différentes lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$) entre les différents croisements. (Moyennes±écart type).	195

8.3.9 Effet de l'exposition à une concentration de cuivre (A), d'argent (B) et le mélange (C) sur le développement des larves-D de moules *M. galloprovincialis*, *M. edulis* et les hybrides des deux espèces à 18 °C. L'axe Y secondaire indique le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves malformées. Différentes lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$) entre les différents croisements. (Moyennes±écart type). 197

8.3.10 Effet de l'exposition à une concentration de cuivre (A), d'argent (B) et le mélange (C) sur le développement des larves-D de moules *M. galloprovincialis*, *M. edulis* et les hybrides des deux espèces à 22 °C. L'axe Y secondaire indique le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves malformées. Différentes lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$) entre les différents croisements. (Moyennes±écart type). 198

9.2.1 Les voies d'effets indésirables potentiellement induites lors d'une contamination métallique au cuivre et à l'argent et d'un stress thermique chez les premiers stades de vie de la moule méditerranéenne. 217

Liste des tableaux

1.1	Concentration du cuivre dans différents compartiments et sites dans le monde	22
1.2	Toxicité d'Argent ($\mu\text{g/L}$) sur les premiers stades de vie des différentes espèces aquatiques	31
3.1	Malformations larvaires identifiables sur les larves D de <i>Mytilus galloprovincialis</i>	66
3.2	Limite de détection (LD) et limite de quantification (LQ) du cuivre et de l'argent pour le four et l'ICP-OES.	70
3.3	Les différents paramètres utilisées lors du dosage par Spectromètre d'émission optique couplée au plasma inductif : ICP-OES.	71
4.1	Concentrations de cuivre et d'argent dissous dans les solutions de contamination simples et en mélanges à 18 °C.	95
4.2	Valeurs des CE50-48 h ($\mu\text{g/L}$) avec des intervalles de confiance à 95 %, CE5, CE10, CE20, CE25 de cuivre et d'argent seuls à des températures différentes.	99
4.3	48h-CE50 \pm CI95% ($\mu\text{g / L}$), CEx ($\mu\text{g / L}$) et TU pour le mélange d'Ag et de Cu à des concentrations toxiques égales à 50% et à différentes températures.	101
4.4	Toxicité de l'argent (EC50 en $\mu\text{g/L}$) chez les embryons et les larves de différents invertébrés aquatiques.	103
5.1	Conditions d'exposition et paramètres suivis pour les analyses phénotypique, génotoxique et transcriptomique sur larves D de <i>M. galloprovincialis</i>	111
5.2	Concentrations de cuivre et d'argent dans les solutions de contamination.	114
5.3	Accumulation de Cu et d'Ag dans les larves de moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> exposées au Cu, à l'Ag et à leur mélange avec un gradient croissant de température.	115

5.4	Expression différentielle des gènes d'intérêt, cat, sod, gst, hsp27, hsp70, hsp90, calreticulin, fk506, mt10, mt20, ribbo-112 et ribo-S27, chez les larves-D de la moule méditerranéenne <i>M. galloprovincialis</i> au cours de l'analyse de l'effet seul ou combiné de la température (18, 20 et 22 °C) et de l'exposition au Cu et/ou à l'Ag.	117
5.5	Coefficients de corrélation de Pearson entre les variables chimiques, biochimique et transcriptomiques étudiées. Les chiffres en rouges représentent des corrélations significatives $p < 0,05$	122
6.1	Conditions d'exposition et paramètres suivis pour les analyses phénotypique, génotoxique et transcriptomique	132
6.2	Expression différentielle des gènes d'intérêt, p53 ; caspase-3 ; ADN-ligase et topoisomérase, chez les larves-D de la moule méditerranéenne <i>M. galloprovincialis</i> au cours de l'analyse de l'effet seul ou combiné de la température (18, 20 et 22°C) et Cu et/ou à l'Ag. . .	144
7.1	Conditions d'expositions et paramètres suivis appliquées pour les analyses comportementale et enzymatique (AChE).	158
9.1	Gamme de tolérance thermique des premiers stades de vie de différentes espèces de bivalves.	208
9.2	Toxicité du Cuivre chez les larves de différents invertébrés aquatiques.	209
9.3	Aperçu des principales études concernant les interactions entre la température et les produits chimiques.	211

Liste des symboles

AChE	Acétylcholinestérase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
CE50	Concentration efficace médiane
CO ₂	dioxyde de carbone
EC _x	Concentrant efficace montrant x pourcent d'effet
EROs	Espèces réactives de l'oxygène
ET	Ecart type
ETMs	éléments traces métalliques
Fe	Fer
FI	Facteur d'induction
fpg	Formamidopyrimidine DNA glycosylase
FR	Facteur de répression
FSW	Eau de mer filtrée
GIEC	Groupement d'Expert Intergouvernemental pour l'Etude du Climat
GPX	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transférases
GST	Glutathion-S-Transférases

LISTE DES TABLEAUX

Hg	Mercure
HSP	Protéines de choc thermique
kDa	Kilo Dalton
MTF-1	facteur de transcription métallique 1
Mts	Métallothionéines
Mts	Métallothionéines
p.s	poids sec
Pb	Plomb
Se	Sélénium
SOD	Superoxyde dismutases
TU	Unité Toxique
TUsum	Somme des Unités Toxiques
Zn	Zinc

Introduction

Contexte de l'étude

Les zones côtières sont parmi les écosystèmes les plus précieux de la planète (Elliott & Whitfield, 2011) et sont pourtant parmi les plus menacés au monde (Bassett et al., 2013). Leur position à l'interface terre-mer, la richesse et la diversité des ressources disponibles dans ces zones ont amené à une concentration des populations et des activités humaines le long des côtes et des estuaires à travers le monde (Crossland et al., 2005). La pollution, l'eutrophisation, l'industrialisation et l'urbanisation ont continuellement des répercussions sur la durabilité de l'environnement côtier. Le défi majeur auquel les humains sont confrontés aujourd'hui est de savoir comment gérer l'utilisation de ce secteur afin que les générations futures puissent également profiter de ces ressources. Une évaluation récente des impacts de la pollution marine provenant de sources terrestres a révélé que la dégradation de l'environnement marin se poursuit et s'est même intensifiée à plusieurs endroits ces dernières années (GESAMP, 2001).

En raison des activités anthropiques croissantes, les milieux côtiers sont de plus en plus exposés à divers contaminants qui sont considérés comme une menace pour la biodiversité marine. Parmi les contaminants retrouvés dans l'environnement, le cas des métaux traces est assez préoccupant car ils ne sont pas biodégradables. Les écosystèmes aquatiques sont exposés à une variété de métaux dont les formes chimiques et les concentrations sont régies par des processus géochimiques naturels et des activités anthropiques. Ces métaux incluent à la fois des éléments essentiels nécessaires pour les processus biologiques (Cuivre) et des métaux non essentiels sans fonction biologique connue (Argent). Le cuivre (Cu) est un polluant commun de l'environnement marin, largement utilisé dans l'industrie électrique, la plomberie et dans les peintures antisalissure, les fongicides et les herbicides (Claisse & Alzieu, 1993). Le cuivre (Cu) est un oligo-élément essentiel qui peut être toxique pour les espèces aquatiques à des concentrations élevées (White & Rainbow, 1985). Sa concentration est souvent élevée dans les sédiments (28-233 µg/g poids sec) (Haynes & Loong, 2002) et dans les eaux interstitielles (Cevik et al., 2008). De plus, la toxicité du cuivre a été démontrée pour les organismes

aquatiques, particulièrement au cours des stades de vie précoces (Manzl et al., 2004; Mai et al., 2012; Gamain, 2016). L'argent (Ag) est un polluant préoccupant dans les eaux marines en raison de sa toxicité, de sa chimie et de sa biodisponibilité (Wang & Rainbow, 2005; Luoma, 2008; Fabrega et al., 2011). L'Ag est l'un des métaux traces les plus toxiques connus surpassé seulement par le mercure (Luoma et al., 1995). La contamination de l'eau par l'argent est une préoccupation pour les écosystèmes marins, en raison d'une part de son utilisation croissante comme biocide et agent antimicrobien dans l'habillement, les produits d'entretien, les cosmétiques et les produits d'hygiène personnelle (Luoma, 2008), et d'autre part de sa toxicité chez les invertébrés marins et les poissons. Même si les concentrations dans les eaux contaminées peuvent sembler faibles (0,01-0,1 µg/L), les risques environnementaux ne peuvent pas être écartés. L'argent est inclus dans La directive sur les produits biocides de la Commission Européenne. L'Agence américaine pour la protection de l'environnement (USEPA) l'a désigné également comme un polluant prioritaire dans les eaux naturelles (USEPA, 2014).

Les changements climatiques constituent aujourd'hui une pression supplémentaire qui menace la diversité biologique. En 2001, le Groupe intergouvernemental d'experts sur l'évolution du climat (GIEC) prévoyait une augmentation des concentrations atmosphériques mondiales de CO_2 et des élévations de la température qui influeraient de plus en plus sur la zone côtière (Houghton et al., 2001). Selon les différents scénarios du GIEC, une augmentation de 1,4 à 5,8 °C est prévue d'ici la fin du 21ème siècle (IPCC, 2014). Dans les zones côtières, le degré de réchauffement pourrait être plus accentué (Helmuth et al., 2002). Au cours des 30 dernières années, la température moyenne de surface de la mer a augmenté de $0,25 \pm 0,13$ °C par décennie (Lima & Wethey, 2012). Le réchauffement climatique peut influencer la chronobiologie des espèces et notamment les périodes de reproduction et/ou la migration, la durée des phases de croissance, la fréquence des infestations parasitaires et l'apparition de nouvelles maladies. Les changements prévus risquent donc d'engendrer des modifications de la répartition des espèces et des densités de populations, par un déplacement des habitats. Ainsi, un changement de la composition de la majorité des biocénoses actuelles est probable. De même, les risques d'extinction d'espèces déjà vulnérables sont de nature à augmenter significativement. En fait, cela concerne en particulier les espèces dont l'aire de répartition climatique est restreinte, celles qui ont des besoins très spécifiques en matière d'habitat et/ou les petites populations naturellement plus vulnérables face à une modification de leur habitat.

En conséquence, pour survivre, les organismes aquatiques doivent faire face à un ensemble complexe de facteurs de stress naturels et anthropiques, qui interagissent entre eux et qui varient à la fois dans l'espace et dans le temps (Schulte, 2007). Selon le rapport de l'Environmental Protection Agency des États-Unis (USEPA, 2004),

l'un des obstacles cruciaux dans l'évaluation des risques est de comprendre les multiples facteurs de stress affectant les organismes, les populations et les écosystèmes. Ce problème est particulièrement difficile à résoudre parce que différents facteurs de stress peuvent affecter des voies physiologiques et biochimiques apparentées, ou induire des réponses cellulaires se chevauchant (NRC, 2000). En conséquence, il existe de nombreuses possibilités d'effets additifs, synergiques et/ou antagonistes parmi les réponses cellulaires et organiques à ces facteurs de stress.

Les moules du genre *Mytilus spp.* constituent un modèle d'intérêt en toxicologie environnementale (Rittschof & McClellan-Green, 2005; Taleb et al., 2007). Elles sont largement utilisées dans les programmes de bio-surveillance (WADE et al., 1998). Outre leur importance écologique et économique, ce genre a acquis un rôle important comme bio-indicateur en raison de leur mode de vie sessile et filtreur ce qui leur permet de filtrer la nourriture et donc accumuler les contaminants (Pruell et al., 1986). De plus, ces espèces sont généralement euryhaline, très abondantes et à large répartition géographique. En outre, la possibilité de travailler sur différentes classes d'âge (Naciri, 1998), ainsi que l'augmentation des connaissances sur sa biochimie et sa physiologie, permettent maintenant d'interpréter raisonnablement les réponses des biomarqueurs afin d'estimer les menaces sur des organismes (Depledge & Fossi, 1994). Tout cela rend les moules *Mytilus* particulièrement intéressantes pour la bio-surveillance (Serafim et al., 2011; Marigómez et al., 2013) et pour l'examen des liens entre les changements dans les facteurs abiotique, en particulier la température, et les changements dans les modes de distribution sur différentes échelles temporelles et spatiales. Ce groupe contient deux espèces importantes dont la répartition de chacune est fonction de la température. La moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), qui est une espèce d'eau chaude et occupe principalement les habitats côtiers en Méditerranée et dans l'Atlantique dans le golfe de Gascogne jusqu'au Royaume-Uni (Skibinski et al., 1983; McDonald et al., 1991). La moule commune *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758), est une espèce occupant les régions tempérées aux régions froides le long des côtes atlantiques européennes (Hilbish et al., 2012). Le chevauchement de ces deux espèces sœurs a créé une zone hybride mosaïque, avec une alternance des populations hybrides et populations parentales pures du Golfe de Gascogne au nord de l'Écosse (Coustau et al., 1991; Gosling, 1992; Bierne et al., 2003; Hilbish et al., 2012). L'hybridation n'est pas un phénomène rare chez les organismes marins (Gardner, 1997) avec jusqu'à 18 % d'hybridation d'espèces dans la nature (Mallet, 2005). L'hybridation naturelle peut conduire à la formation d'espèces hybrides viables adaptées aux nouveaux écotones et le renforcement des barrières reproductives (Arnold, 1992). Cependant, les études empirique et théorique sur les zones hybrides se sont concentrées principalement sur les espèces terrestres (Barton & Hewitt, 1985; Arnold, 1992).

Les premiers stades de développement sont le maillon le plus vulnérable du cycle de vie des bivalves et des autres invertébrés marins (Pechenik, 1999). Cette hypersensibilité est due au fait que la fécondation chez les invertébrés aquatiques se réalise dans la colonne d'eau où la fécondation externe se produit (Marshall, 2006). Par conséquent, les gamètes, les embryons et les stades larvaires sont directement exposés au mélange de substances chimiques présentes dans l'eau (Epel, 2003). L'exposition aux polluants survenant au cours de cette période de développement peut être particulièrement préjudiciable à l'organisme (Gilbert, 2003). L'effet des conditions environnementales sur les performances larvaires est crucial pour comprendre la dynamique des espèces. Pour les métaux, il est bien connu que les concentrations provoquant des effets létaux sur les embryons et les larves sont des ordres de grandeur inférieurs à ceux qui sont mortelles pour les adultes (Ringwood, 1991). Cela a permis l'utilisation des larves de bivalves dans la bio-surveillance de la pollution (His et al., 1999a) et a stimulé l'étude de la sensibilité des premiers stades de vie des moules aux contaminants (Pavidi et al., 1994; Beiras & His, 1995; Beiras & Albentosa, 2004). Le test embryo-larvaire de toxicité de bivalves s'est avéré fiable, sensible et écologiquement pertinent (Beiras, 2002; Nendza, 2002). Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont été publiées sur l'utilisation des embryons de bivalves dans l'évaluation des effets des contaminants, des effluents industriels et des sédiments (His et al., 1999b; Stronkhorst et al., 2004; Quiniou et al., 2005, 2007).

Ce manuscrit de thèse est organisé en 5 parties principales :

La première partie représente une synthèse bibliographique sur l'état des connaissances dans lequel s'inscrit ce travail de thèse en présentant la productivité et la sensibilité des zones côtières, le réchauffement climatique et ses effets sur les réponses écologiques et démographiques des espèces, la pollution métallique, le modèle biologique et la sensibilité des stades de vie précoces dans un contexte de changement global et en situation de multi stress.

La deuxième partie est consacrée à la description détaillée de l'ensemble des méthodes expérimentale et analytique utilisées au cours de ce travail de thèse.

La troisième partie s'intéresse à la présentation des résultats obtenus suite à l'exposition des larves de moule à des températures croissantes et à la contamination métallique (cuivre et argent). Cette partie est divisée en 5 chapitres, chacun est constitué d'une introduction qui présente l'état des connaissances actuelles sur les études envisagées, les protocoles expérimentaux propres à chaque série d'expositions, les résultats ainsi qu'une discussion des résultats obtenus.

La quatrième partie est consacré à la discussion générale des résultats obtenus au regard des objectifs et hypothèse de ce travail de thèse.

Enfin, une conclusion générale qui synthétise les principaux résultats obtenus et propose une ouverture vers de nouvelles perspectives d'étude.

Chapitre 1

Synthèse Bibliographique

La pluridisciplinarité des travaux effectués durant cette thèse requiert des connaissances générales et spécifiques en importance des zones côtières, en scénarios présents et futurs de changement climatique et en vulnérabilité des stades embryolairvaires des mollusques bivalves. Ainsi, ce chapitre vise à faire l'état des connaissances nécessaire à la bonne compréhension des travaux menés. Une synthèse des notions essentielles sur les zones côtières, le changement climatique et en particulier le réchauffement climatique, les éléments traces métalliques (ETMs) à l'interface continent-océan, l'importance des stades précoces de développement et leurs vulnérabilité dans un contexte de changement global, à la sensibilité des organismes aquatiques et sur le contexte scientifique de l'étude menée sur le modèle biologique : les moules de genre « *Mytilus. spp* ».

1.1 Zones côtières

Les océans couvrent environ 71 % de la surface de la terre et jouent un rôle clé dans la régulation de climat et la modulation des cycles bio-géochimiques (Pörtner et al., 2014). Ils recèlent d'importantes ressources naturelles. Les écosystèmes aquatiques sont des composantes essentielles des ressources hydriques et dans le bien-être de tous les organismes vivants. Ils remplissent de nombreuses fonctions environnementales importantes telles que le recyclage des nutriments, la purification de l'eau, l'atténuation des inondations, la recharge des eaux souterraines et fournissent des habitats pour la faune. Ils jouent aussi un rôle fondamental dans le contrôle du climat. Ils sont des puits principaux de carbone. Les écosystèmes aquatiques sont très importants pour le domaine industriel et touristique, en particulier dans les régions côtières (Burke et al., 2001).

Généralement, la zone côtière est définie comme l'interface terre-mer (Hinrichsen, 1998). Cependant, il est difficile d'établir une définition universelle de ses limites géographiques (European Environment Agency, 1995). Selon la Direction de l'environnement de l'OCDE (l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques), la définition de la zone côtière doit varier selon le type de problème ou de question à résoudre et les objectifs de l'étude. Dans le cadre du programme LOICZ (Land-Ocean Interactions in the Coastal Zone), la zone côtière a été définie comme un compartiment global « s'étendant à partir des plaines côtières au bord extérieur des plateaux continentaux, correspondant approximativement à la région qui a été alternativement inondée et exposée pendant les fluctuations du niveau de la mer de la fin de Quaternaire » (Holligan & de Boois, 1993). D'une manière plus générale, le LOICZ a proposé de délimiter ce territoire comme étant la zone comprise entre zéro et 200 mètres de profondeur par rapport au niveau de la mer (Fig 1.1.1) (Pernetta & Milliman, 1995).

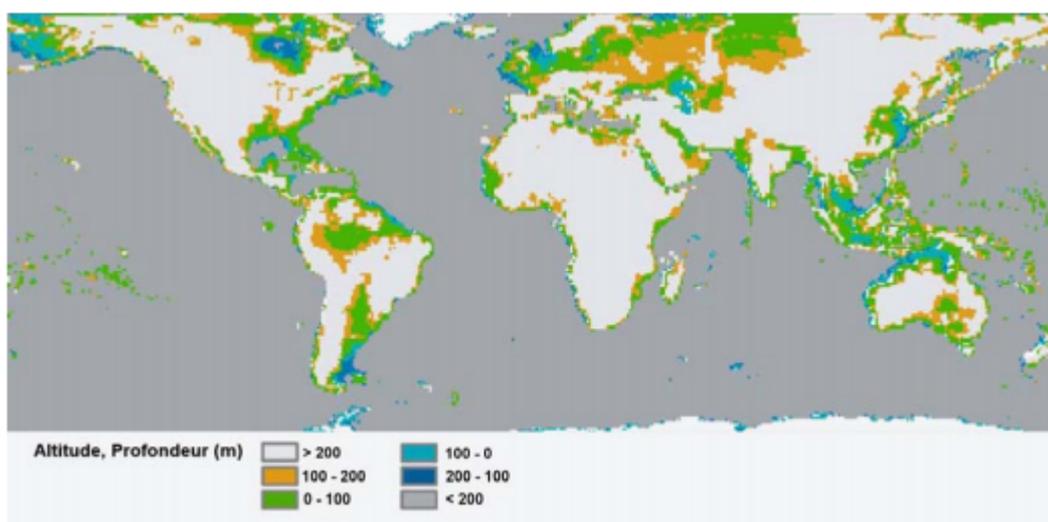


FIGURE 1.1.1 – Extension des zones côtières dans la définition du programme international LOICZ (LOICZ, 2005)

1.1.1 Productivité des zones côtières

Les eaux côtières représentent 8-10 % de la surface de l'océan et seulement 0,5 % de son volume. Toutefois, elles constituent une fraction importante en termes de valeur économique, sociale et écologique (Hoepffner & Zibordi, 2009). Elles contribuent à au moins 25 % de la production primaire mondiale, 90 % des activités de pêche mondiale, 60 % de la valeur économique des écosystèmes marins, 80 % de la sédimentation de la matière organique et 50 % de la dénitrification globale (Pernetta & Milliman, 1995; Costanza et al., 1997). De plus, le milieu marin côtier présente divers habitats caractérisés par un niveau élevé de biodiversité (Ray & Grassle, 1991). Des recherches récentes indiquent que la diversité marine est beaucoup plus vaste et vulnérable qu'on ne le pensait (Hendriks & Duarte, 2008). Les scientifiques indiquent un nombre écrasant de taxons inconnus dans les habitats inexplorés, avec des estimations de nombre d'espèces totales suggérant que moins de 1 % des espèces marines benthiques sont connues actuellement (Briggs, 1994; Snelgrove, 1999).

Les écosystèmes côtiers sont des systèmes complexes qui jouent un rôle écologique majeur et l'importance de leurs préservations a été mise en évidence au cours des dernières décennies par l'adoption de plusieurs conventions et projets internationaux entre autres : projets européens BioMar (Biological Markers of environmental contamination in marine ecosystem), BEEP (Biological Effects of Environmental Pollution in marine coastal ecosystems), organisations européennes CIEM (International Council for the exploration of the Sea), OSPAR (Oslo-Paris Convention), WFD (The European Water Framework Directive) etc....

Les zones côtières forment des écosystèmes complexes et diversifiés qui jouent un rôle important dans la productivité des environnements côtiers. Les zones côtières abritent généralement des récifs, des mangroves, des zones humides et des zones intertidales qui sont essentiels pour la reproduction, la croissance et l'alimentation de la majorité des espèces marines (poissons, invertébrés, etc...) (Kennedy et al., 2002). En outre, en raison de certaines caractéristiques, telles que les faibles profondeurs, l'eau chaude, la turbidité, la présence de divers et riches habitats, la disponibilité alimentaire et la protection vis à vis des prédateurs, ces zones servent de lieu de ponte et d'alevinage, assurant ainsi la croissance et la survie des jeunes stades de nombreuses espèces marines (Meng et al., 2002; Elliott et al., 2007; Franco et al., 2008).

1.1.2 Sensibilité des zones côtières aux forçages anthropiques et climatiques

À l'échelle mondiale, plus de 3 milliards de personnes vivent à proximité des zones côtières. La densité de population le long de cette région augmente la pres-

sion sur l'utilisation des ressources naturelles menant ainsi à la destruction, la dégradation et la fragmentation des habitats. La pêche, la mariculture, le transport maritime, le dragage ainsi que le rejet des eaux usées et de produits chimiques industriels dans l'eau a des effets néfastes sur les écosystèmes marins côtiers. Néanmoins, la croissance exponentielle de la population humaine et l'industrialisation croissante posent de graves menaces pour l'environnement et les ressources aquatiques (Bowen & Depledge, 2006). Les zones côtières sont influencées aussi par l'interaction de multiples facteurs abiotiques, y compris la température, la concentration en oxygène et la salinité de l'environnement (Schulte, 2007). Au cours des 100 dernières années, ces habitats ont également subi un remarquable changement des conditions climatiques, soumettant les organismes qui vivent dans ces habitats, déjà difficiles, à une multitude de facteurs de stress environnementaux (Température, salinité, ...).

Les écosystèmes lagunaires côtiers sont parmi les zones côtières les plus impactés (Lotze et al., 2006). Des grandes quantités de contaminants ont été accumulées dans les eaux et les sédiments des lagunes côtières en raison de l'activité industrielle passée. L'un des enjeux actuel est l'étude du devenir de ces contaminants et de l'évolution des conditions environnementales, y compris celles liées au changement climatique (Noyes et al., 2009). Les changements de température et de salinité impliquent d'autres modifications telles que la disponibilité de l'oxygène ou de la ressource alimentaire. Par ailleurs, ils modifient la biodisponibilité des contaminants, le métabolisme et l'excrétion de ceux-ci par les organismes. Ces effets sont plus marqués dans les lagunes côtières caractérisées par des eaux peu profondes où les cycles bio-géochimiques et les bilans hydriques sont modifiés rapidement par des changements climatiques.

1.2 Changement climatique

Le changement climatique est une réalité de la vie sur terre, de même que l'évolution et l'extinction des espèces. Cependant, à l'exception des événements catastrophiques tels que les éruptions volcaniques massives et les astéroïdes, les changements environnementaux se produisent généralement sur des échelles de temps qui vont de siècles à des millions d'années (Kennedy et al., 2002). Le changement climatique, qui affecte naturellement notre planète, survient aujourd'hui beaucoup plus rapidement et avec plus d'ampleur que dans les années passées, du fait de l'influence anthropique (Pinto & Ferranti, 2016). Les activités humaines ont modifié profondément de nombreux aspects du système de la Terre, y compris le climat et la bio-géochimie, au point que certains affirment que nous entrons dans une nouvelle ère géologique, l'Anthropocène (Steffen et al., 2011).

Face à la menace climatique, les scientifiques tentent de mieux comprendre le

phénomène et de dresser les scénarios d'évolution. Pour cela, plusieurs programmes internationaux ont été mis en place pour étudier les modifications climatiques, naturelles ou/et anthropiques. Entre autres, on peut citer : le Programme Mondial de Recherches sur le Climat (PMRC) mis en place en 1980, le Programme International Géosphère Biosphère (PIGB) lancé en 1986, ou bien encore le Groupement d'Expert Intergouvernemental pour l'Étude du Climat (GIEC) fondé en 1988.

Actuellement, la communauté scientifique admet que le forçage anthropique sur le système climatique est médié principalement par les gaz à effet de serre, et principalement le CO_2 (Harley et al., 2006). Depuis la révolution industrielle, les niveaux atmosphériques de gaz à effet de serre, qui sont le dioxyde de carbone (CO_2), le méthane (CH_4) et le protoxyde d'azote (N_2O), ont tous augmenté pour atteindre en 2011 une concentration de 391 ppm, 11,1803 ppb et 324 ppb respectivement (IPCC, 2014). Ces niveaux sont les plus élevés de l'histoire de la Terre sur les 650.000 à 800.000 dernières années (Lüthi et al., 2008). Les modèles climatiques actuels du GIEC prévoient une augmentation de 720 à 1000 ppm des niveaux atmosphérique de CO_2 d'ici 2100 (Fig 1.2.1) (IPCC, 2014).

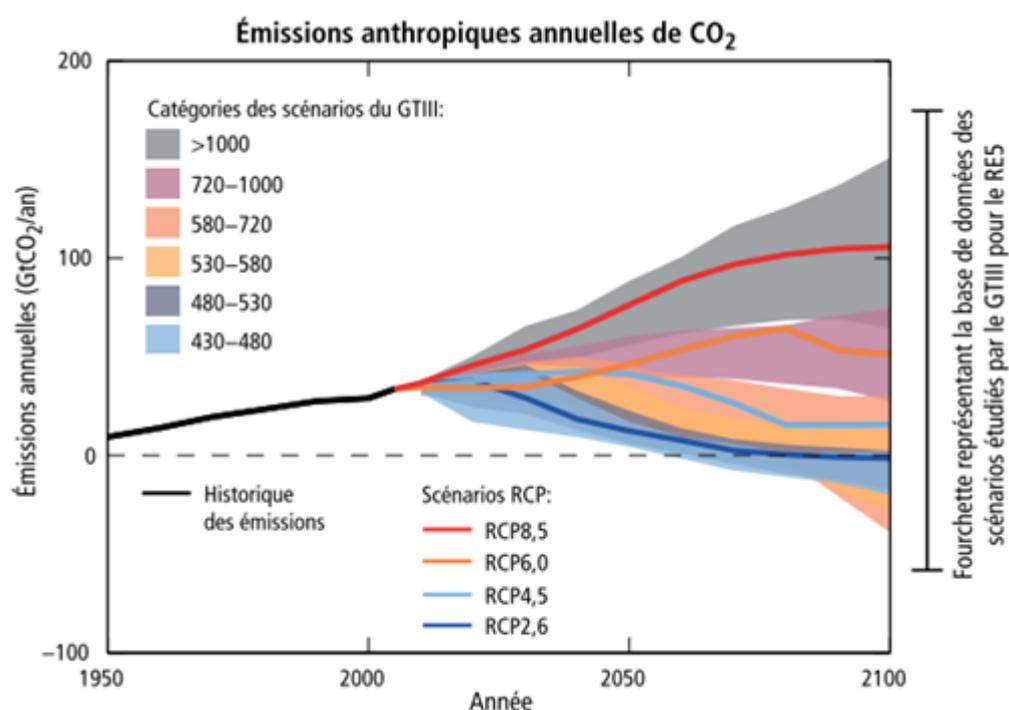


FIGURE 1.2.1 – Augmentation des niveaux atmosphériques de dioxyde de carbone (CO_2) d'ici 2100 selon les modèles climatiques actuels du GIEC (IPCC, 2014)

1.2.1 Réchauffement climatique

En fait, le phénomène de « l'effet de serre » est un composant naturel de système de la vie sur terre. Les gaz, présents naturellement dans l'atmosphère, absorbent une partie du rayonnement thermique de la terre pour la réchauffer et assurent une température moyenne à la surface du globe de 15 °C au lieu de -19 °C (Treut et al., 2007). Cependant, l'augmentation des concentrations atmosphériques des gaz à effet de serre amplifie ce phénomène de piégeage thermique et provoque ainsi l'accroissement de la température du globe (Maniez & Laug, 2009). Depuis la fin du 19^{ème} siècle, la température moyenne à la surface de la terre a augmenté de 0,6 °C. De plus, les trois dernières décennies ont été successivement les plus chaudes depuis 1850, et probablement les plus chaudes, connues dans l'hémisphère nord depuis 1 400 ans. Selon les différents scénarios de GIEC, une augmentation de 1,4 à 5,8 °C est prévue d'ici la fin de siècle (IPCC, 2014).

Ce réchauffement affecte les différentes composantes du système climatique : atmosphère, lithosphère et océan. Ce dernier présentant plus de 1000 fois la capacité thermique (appelée aussi capacité calorifique) de l'atmosphère, l'océan joue sans aucun doute un rôle crucial dans la régulation climatique du globe. Levitus et al. (2005) ont montré une augmentation significative de la teneur globale de l'océan en chaleur (0,06 °C; 0-700 m) entre 1957 et 2004. Ces températures sont en hausse et devraient augmenter plus rapidement au cours des prochaines décennies (IPCC, 2014). Dans les zones intertidales et côtière, le degré de réchauffement local et l'amplitude des fluctuations thermiques peuvent être plus accentués (Hel-muth et al., 2002). La température de surface de la mer, de plus de 70 % des côtes du monde, a considérablement augmenté au cours des 30 dernières années (Lima & Wethey, 2012). Le taux moyen d'accroissement de température est de $0,18 \pm 0,16$ °C par décennie. Ces valeurs sont plus importantes que celles de l'océan global où la moyenne du changement est d'environ 0,1 °C par décennie dans les 75 premiers mètres de l'océan pendant la période de 1970 à 2009 (IPCC, 2014) (Fig 1.2.2).

1.2.2 Effet du réchauffement climatique sur les zones côtières

Actuellement, il y a un consensus scientifique solide indiquant que les écosystèmes marins côtiers sont menacés par le changement climatique anthropique (Harley et al., 2006; Ipcc, 2007), en particulier le réchauffement climatique. En fait, l'augmentation de température des eaux de surface est à l'origine d'importantes perturbations dans les zones côtières (Harley et al., 2006). Les températures extrêmes (hautes et basses) peuvent être mortelles pour les organismes. Dans les

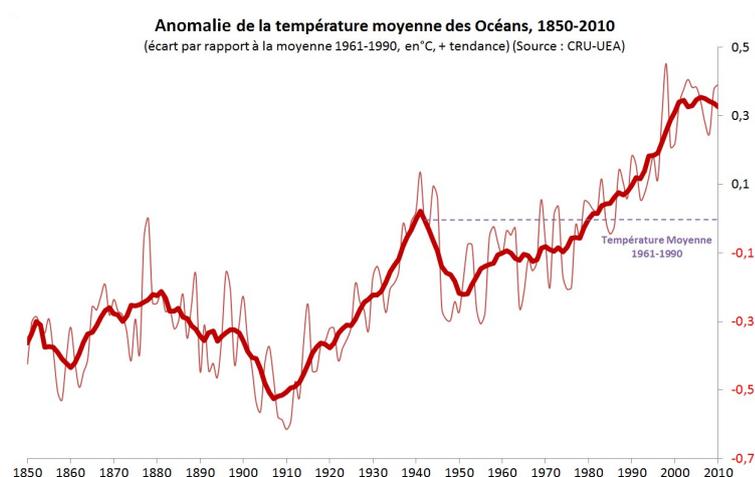


FIGURE 1.2.2 – Augmentation de la température des océans pendant les 3 dernières décennies (1850-2010) (www.lescrises.fr)

régions tempérées, l'augmentation de température peut être stressante voire mortelle pour les organismes sessiles. De nombreuses espèces sont sensibles à une élévation de quelques degrés par rapport aux températures habituelles (Kennedy et al., 2002). Des travaux de Kennedy & Mihursky (1971) sur des bivalves estuariens ont montré la sensibilité de ces organismes à des légères augmentations de températures en se rapprochant des températures létales. Parfois, une augmentation d'un degré Celsius induit une augmentation du pourcentage de mortalité de 0 % à 100 %. Il est prévu que les hausses de température dans le siècle à venir puissent être supérieures à 1 °C (Fig 1.2.3) (IPCC, 2014).

La température est probablement le facteur climatique le plus influant sur la biologie des organismes marins (Brierley & Kingsford, 2009) ; allant des effets sub-cellulaires jusqu'au niveau de la communauté, avec des effets directs et indirects sur la physiologie, l'ontogenèse, les interactions trophiques, la biodiversité, la phénologie et la biogéographie des organismes (Hochachka & Somero, 2002; Harley et al., 2006). Comme de nombreux organismes marins vivent en limite de tolérance thermique (Somero, 2002; Hughes et al., 2003), l'augmentation de la température peut avoir un impact négatif sur les performances et la survie (Harley et al., 2006). À des niveaux sub-létaux, la température affecte le développement et le métabolisme, modifie le comportement des animaux ainsi que la répartition des organismes ; et elle agit en même temps que d'autres facteurs environnementaux tel que l'oxygène dissous. En fait, la température influence la quantité d'oxygène que l'eau peut contenir (une eau plus chaude contient moins d'oxygène que l'eau froide). La plupart des organismes aquatiques extraient l'oxygène nécessaire à leurs besoins métaboliques et leur survie à partir de l'eau dans laquelle ils vivent. Les interactions

entre l'augmentation de température et la diminution d'oxygène devraient réduire le nombre d'habitats disponibles pour certaines espèces aquatiques (Harley et al., 2006). De plus, la température peut perturber les cycles naturels de reproduction, le taux des gamètes et le développement larvaire des invertébrés marins (PRZESLAWSKI et al., 2008; Kennedy et al., 2002). Comme exemple de conséquences du réchauffement des océans, on peut citer la mortalité massive de 25 espèces de macro-invertébrés benthiques rocheux (principalement gorgones et éponges) dans toute la région Nord-Ouest de la méditerranéenne qui a subi une vague de chaleur pendant l'été 2003 (GARRABOU et al., 2009). La vague de chaleur a provoqué un réchauffement anormal de l'eau de mer, qui a atteint les températures les plus élevées jamais enregistrées dans les régions étudiées, entre 1 et 3 °C au-dessus des valeurs climatiques normales (à la fois moyenne et maximale). Ces augmentations sont certainement dans la gamme de température prévue pour le réchauffement climatique des océans à long terme. Les auteurs suggèrent aussi que les vagues de chaleur deviendront plus fréquentes à l'avenir provoquant ainsi une crise majeure de la biodiversité dans la mer Méditerranée.

La température influence directement et/ou indirectement l'abondance des populations et la distribution des d'organismes aquatiques. Bien que des températures plus élevées n'aboutissent pas forcément à l'extinction d'une espèce, cependant celles-ci peuvent être éliminées de son aire de répartition géographique. Les changements de température, aussi faibles que 1 °C, peuvent avoir des effets importants sur la répartition des espèces dans un court laps de temps (Harley et al., 2006).

1.2.3 Réponses écologiques induites par le changement climatique

— *Changement biogéographique*

Afin de faire face aux changements environnementaux, les espèces doivent s'adapter et/ou s'acclimater in situ ou modifier leur répartition géographique (Maggini et al., 2011). La compréhension de ce compromis a fait l'objet de plusieurs projets de recherche portant sur les réponses à long terme des populations, des communautés et de la biodiversité au changement global, avec la redistribution des espèces (Root et al., 2003; HICKLING et al., 2006; Wernberg et al., 2011; Bellard et al., 2012). Le changement climatique a modifié la distribution spatiale des espèces en modifiant l'équilibre entre la colonisation et l'extinction, conduisant à des changements géographiques majeurs dans les territoires naturelles des espèces (Vazquez, 2005; Sinervo et al., 2010; Poloczanska et al., 2013).

Il est largement admis que la biogéographie marine est largement influencée par les effets directs de la température (Murawski, 1993). Les effets induits par le climat sur les organismes marins sont donc essentiellement imputables à un régime

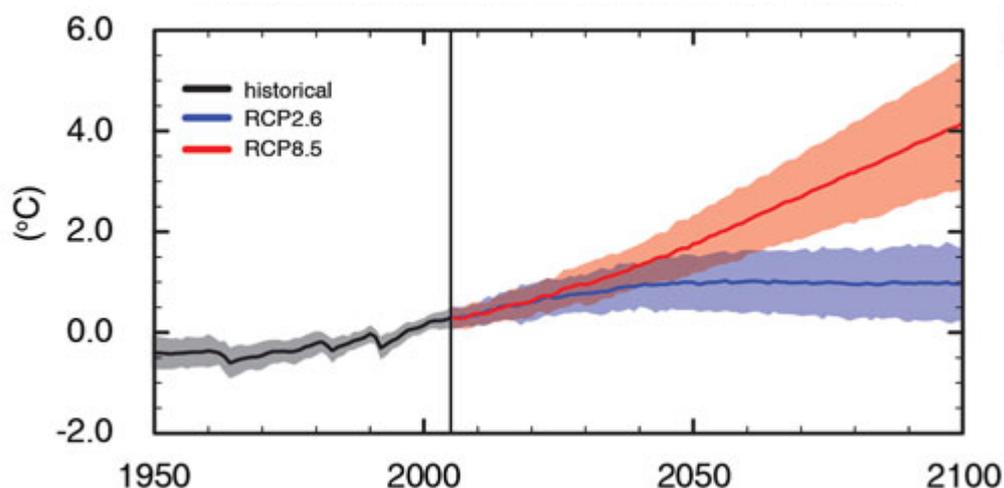


FIGURE 1.2.3 – Changement global de la température moyenne de surface 2006-2100 tel que déterminé par des simulations multi-modèles. Les séries chronologiques des projections et une mesure d'incertitude (ombrage) sont indiqués pour les scénarios RCP2.6 (bleu) et RCP8.5 (rouge). (IPCC, 2014)

de changement de température. Ces effets peuvent être directs, par les effets de la température elle-même, ou indirects, par le biais de modifications induites par la chaleur sur la composition de la chaîne alimentaire ou par la fluctuation des disponibilités alimentaires dans le temps et l'espace. De tels changements peuvent commencer avec des fluctuations de la disponibilité du phytoplancton, influencée par la température, en changeant les courants océaniques et la stratification ou la modification des niveaux de nutriments (Einfluss et al., 2004; Wiltshire et al., 2008).

— *Les changements dans la composition des espèces, la diversité et la structure des communautés*

Le changement climatique, ainsi que l'exploitation, la modification et la pollution de l'habitat, induisent une réduction de l'abondance de nombreuses espèces marines et accroissent la probabilité de leur extinction. Bien que de nos jours, nous ne connaissions pas d'extinction définitive d'une espèce marine liée au changement climatique, le risque d'extinction climatiquement induit est maintenant probable pour certaines espèces telles que le mysidacé de la mer méditerranéenne *Hemimysis speluncola* (Lejeusne & Chevaldonné, 2003). Parce que de nombreux écosystèmes marins côtiers sont caractérisés par une faible redondance fonctionnelle (Micheli & Halpern, 2005), la perte locale même d'une espèce pourrait avoir d'importantes conséquences sur la structure des communautés et le fonctionne-

ment des écosystèmes. En revanche, le changement climatique va jouer un rôle déterminant dans la vitesse à laquelle de nouvelles espèces sont introduites dans les écosystèmes. En plus de permettre l'expansion de la répartition naturelle, le réchauffement climatique peut faciliter l'introduction et la diffusion d'une façon volontaire ou accidentellement les espèces étrangères (Bax et al., 2001; Stachowicz et al., 2002).

L'adaptation d'un organisme au stress thermique est un élément déterminant pour sa survie, mais aussi pour sa croissance et ses capacités de reproduction (Angilletta et al., 2002; Renaudeau et al., 2012). Dans un écosystème donné, selon la plasticité de l'organisme ou ses capacités adaptatives, la population va se maintenir sur place, ou migrer si c'est possible, ou encore s'éteindre si les conditions thermiques deviennent trop contraignantes (Parmesan & Yohe, 2003).

1.3 Pollution métallique des zones côtières et lagunaires

Les zones côtières sont d'une importance majeure pour les activités humaines et économiques ; 41 % de la population mondiale (Martínez et al., 2007) et 61 % de la production mondiale brute (Agardy et al., 2005) sont concentrées dans une bande de 100 km de large le long des côtes. Cependant, les activités humaines génèrent de grandes quantités de déchets qui alimentent les milieux marins côtiers en agents pathogènes, matières organiques, des nutriments et substances toxiques (Durrieu de Madron et al., 2011), en particulier éléments traces métalliques (ETMs).

Parmi les contaminants retrouvés dans l'environnement, le cas des métaux lourds est assez préoccupant car ils ne sont pas biodégradables contrairement à la plupart des contaminants organiques. Bien que les métaux soient libérés naturellement (fonds géochimiques), les procédés industriels et agricoles sont à l'origine d'une surproduction, d'un changement de leur spéciation et de leur répartition (Vinot & Pihan, 2005). Par conséquent, la contamination métallique des milieux aquatiques exerce une pression diffuse et chronique sur les organismes vivants se traduisant par des modifications de la biodiversité et des perturbations des processus environnementaux (Roussel et al., 2008).

La pollution métallique s'est accélérée de façon spectaculaire depuis la révolution industrielle (Nriagu, 1979) et elle a considérablement dégradé l'environnement marin côtier au cours des 30 dernières années. Les principales sources d'émissions anthropiques d'ETMs sont les activités minières et de fonderie (Hutton & Symon, 1986) ; d'autres sources importantes sont liées à des activités industrielles, agricoles et urbaines qui ont été en expansion dans les zones côtières depuis le début des années soixante (PNUE / PAM / Plan Bleu, 2009).

1.3.1 Les éléments traces métalliques

Le terme « ETMs » désigne les éléments de la classification périodique formant des cations en solution. Ce sont des éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (environ 65 éléments), caractérisés par une forte masse volumique supérieure à 5 g/cm³ (Adriano, 2001). Les métaux lourds sont non biodégradables et persistants dans l'environnement pendant de longues périodes, provoquant ainsi des problèmes éco-toxicologiques graves. En outre, certains métaux toxiques peuvent se comporter comme des métaux essentiels et avoir ainsi accès à des cibles moléculaires importantes. Les ETMs sont dangereux, car ils ont tendance à se bio-accumuler. La bio-accumulation des métaux dépend de la quantité totale, de la biodisponibilité de chacun des métaux dans le milieu et de la voie et les mécanismes de captation, de stockage et d'excrétion. Si les métaux sont souvent indispensables au déroulement des processus biologiques (oligoéléments), nombre d'entre eux peuvent s'avérer toxiques pour diverses formes de vie, lorsque leur concentration dépasse un certain seuil, elle-même fonction de l'état physico-chimique (spéciation) de l'élément considéré. C'est le cas du fer (Fe), du cuivre (Cu), du zinc (Zn), du sélénium (Se), etc. . . (Adriano, 2001). D'autres ne sont pas nécessaires à la vie et peuvent être même préjudiciables comme le mercure (Hg), le plomb (Pb), le cadmium (Cd), etc. . . (Chiffolleau et al., 2001).

1.3.2 Absorption et élimination des métaux

Pour mieux comprendre les effets des métaux sur les organismes aquatiques, il faut savoir comment les métaux entrent, s'accumulent et interagissent dans les cellules des organismes aquatiques. Chez les mollusques bivalves filtreurs, on distingue généralement deux voies d'entrée des métaux : la voie directe à partir de l'eau qui est en relation avec l'épithélium branchial, et la voie trophique à partir de la nourriture qui est en relation avec l'épithélium intestinal (Cosson et al., 2008). La pénétration des métaux traces nécessite donc le franchissement de l'épithélium et elle est déterminée par des processus se produisant à cette interface. Il s'agit notamment : des caractéristiques de l'interface elle-même ; la réactivité de chaque forme métallique avec l'interface biologique ; la présence d'autres métaux ou de cations majeurs qui peuvent contrarier ou stimuler l'absorption du métal ; et des facteurs tels que la température qui affectent la vitesse des réactions biologiques ou chimiques. En outre, la quantité de métal transportée dans les tissus biologiques peut également être influencée par l'état physiologique de l'organisme ou par des facteurs biologiques impliqués dans le métabolisme des métaux (Luoma, 1983). Les mécanismes de transport des métaux à travers les membranes biologiques dépendent de l'état et la source du métal : dissout ou présent dans la nourriture.

— *Métaux en solution*

La capture des métaux traces en solution chez les organismes aquatique, en particulier les bivalves filtreurs, se fait généralement par (1) diffusion passive des complexes métalliques neutres ou lipophiles (ex : HgCl_2) à travers la membrane plasmique, ce qui ne nécessite aucune dépense énergétique (Luoma, 1983; Phillips & Rainbow, 1994). Il a été montré que ce mode de transport joue un rôle non négligeable chez les espèces marines (Daskalakis, 1996). Outre que la diffusion, le transport peut être facilité par (2) des transporteurs transmembranaires protéiques ou des canaux transmembranaires pour les cations ou par (3) des transporteurs d'anions relativement peu sélectifs (transport de l'anion plus le métal qui y est associé). C'est généralement, la voie (2) qui domine, aussi bien pour les métaux essentiels (maintien de l'homéostasie) que pour les métaux non essentiels qui réussissent à franchir les barrières biologiques en trompant les systèmes de transport cationique.

— *Métaux particuliers*

La contamination métallique par voie trophique suit plusieurs étapes avant que le métal soit pris en charge : l'ingestion de la particule, la solubilisation du métal, soit dans le tractus digestif soit dans les vacuoles créées par invagination de la membrane biologique, qui est favorisée par les conditions physico-chimiques du milieu (pH, oxydo-réduction...). Une fois solubilisés, les métaux doivent franchir la membrane digestive ou vacuolaire selon les mêmes processus que les métaux en solution (Rainbow & Smith, 2010). L'endocytose peut également jouer un rôle important dans le transfert des métaux chez les organismes aquatiques. Ce mécanisme, décrit au niveau des branchies, de l'épithélium du manteau et au niveau de la barrière intestinale (Deb & Fukushima, 2007a; Depledge & Rainbow, 1990), induit l'incorporation des métaux aux lysosomes et leur relargage dans le cytosol.

Toutes ces voies sont possibles pour un même métal et leur importance relative est fonction de la forme chimique sous laquelle se présente le métal dans le milieu (Fig 1.3.1 et Fig 1.3.2). C'est la coexistence de ces mécanismes et la dynamique de la spéciation qui rend si complexe la notion de biodisponibilité.

Une fois dans l'organisme, le métal sera accumulé ou excrété à des degrés divers. Le transport des métaux essentiels vers les tissus spécifiques peut être réalisé par le métal dissous dans l'hémolymphe, ou par une protéine spécifique telle que l'hémocyanine, transferrine... (Depledge, 1989). En outre, les métaux peuvent être séquestrés et stockés dans la cellule par un certain groupe de protéines intracellulaires, les métallothionéines, (Depledge, 1989; Viarengo, 1989; Viarengo & Nott, 1993). Les métaux dépassant les exigences métaboliques sont potentiellement toxiques et doivent être éliminés à partir du tissu spécifique. Le métal peut alors être éliminé de l'animal ou bio-transformé avant stockage éventuellement dans des tissus de stockage spécifiques sous des formes inertes non toxiques (Depledge &

Rainbow, 1990).

1.3.3 Métaux choisis pour l'étude

1.3.3.1 Métal essentiel : le Cuivre (Cu)

Le cuivre est un oligoélément essentiel qui est nécessaire en petites quantités (5-20 µg/g) pour le fonctionnement des systèmes biologiques des êtres vivants (le métabolisme des hydrates de carbone et le fonctionnement de plus de 30 enzymes). Il est un cofacteur pour plusieurs enzymes et métalloprotéines (ex : la métallothionéine) dans de nombreux systèmes biologiques. Au moins 21 enzymes contenant du cuivre sont connues, qui fonctionnent comme des catalyseurs d'oxydo-réduction (ex : la superoxyde dismutase (SOD), la cytochrome C oxydase, la monoamine oxydase) ou des transporteurs de dioxygène (ex : l'hémocyanine) (Weser et al., 1979). Il est également nécessaire pour la formation de l'hémoglobine et de l'hémocyanine, les pigments transportant l'oxygène dans le sang des vertébrés, des mollusques et des crustacés. Cependant, les concentrations du cuivre qui dépassent 20 µg/g peuvent être toxiques (Wright & Welbourn, 2002; Bradl, 2005).

— *Identité, propriétés physiques et chimiques*

Le cuivre est un métal qui se trouve naturellement présent dans la croûte terrestre avec une abondance moyenne d'environ 50 parties par million (ppm) (U.S DHHS, 2004). Le cuivre est un métal de transition qui est présent dans la nature en quatre états d'oxydation : le cuivre élémentaire Cu (0) (métal solide), l'ion cuivreux Cu (I), l'ion cuivrique Cu (II), et rarement Cu (III). Sous forme pure, il a une couleur brun rougeâtre avec une grande ductilité et malléabilité. Il est bien connu pour sa bonne conductivité thermique et électrique (le meilleur après l'argent). Le cuivre a deux isotopes stables, ^{63}Cu et ^{65}Cu , avec les abondances naturels de 69,2 et 30,8 % respectivement ce qui lui donne un poids atomique de 63,54 daltons (Georgopoulos et al., 2001). Du fait de son caractère chalcophile, le Cu se trouve rarement sous forme élémentaire mais essentiellement sous forme de sulfure tel que la chalcopyrite ($CuFeS_2$), la bornite (Cu_5FeS_4), la covelline (CuS), et la chalcocite (Cu_2S).

— *Sources*

Il y a plusieurs sources, anthropiques et naturelles, de cuivre dans les écosystèmes aquatiques. Du fait de sa bonne conductivité thermique et électrique, le cuivre est très utilisé dans l'industrie électronique (ex : fils et câbles électriques. . .). Plusieurs autres propriétés physiques (résistance à la corrosion, malléabilité et plasticité, soudabilité. . .) expliquent sa large utilisation dans différents domaines : la protection du bois, les fongicides, les pigments et les agents anti-salissures dans les peintures, comme additifs nutritionnels pour les animaux et additif aux engrais. Il y a aussi quelques utilisations médicales de cuivre, comme les alliages à base de cuivre utilisés dans les ponts et les couronnes dentaires ainsi que les dispositifs contraceptifs

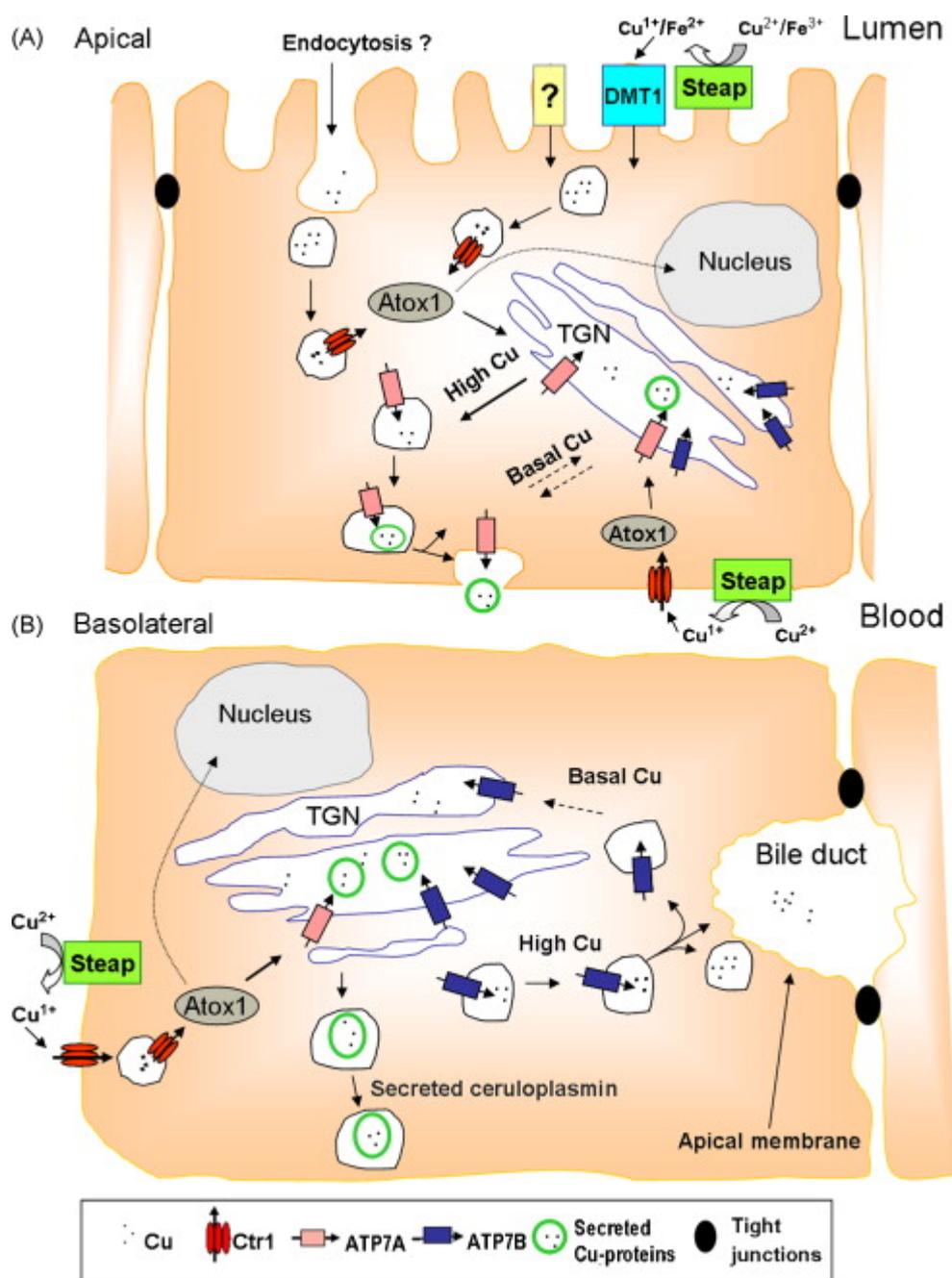


FIGURE 1.3.1 – Modèle proposé des voies d'entrées du cuivre et de leur localisation intracellulaire (Minghetti et al., 2010)

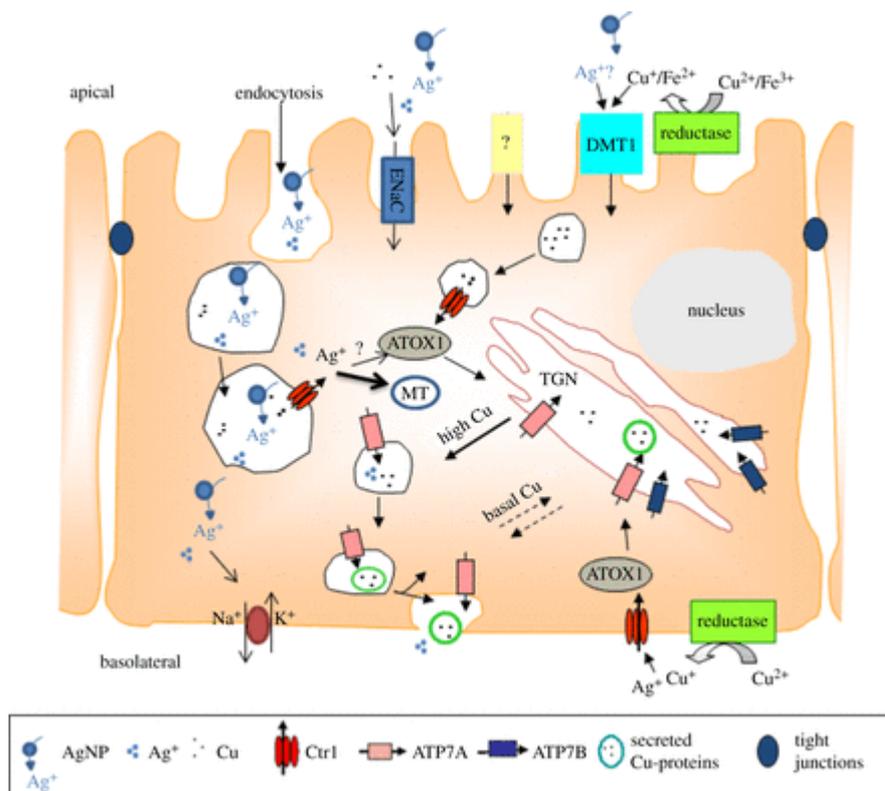


FIGURE 1.3.2 – Modèle proposé des voies d'entrées de l'argent et de leur localisation intracellulaire (Behra et al., 2013)

intra-utérins (Okoro et al., 2011). Dans les eaux, le cuivre provient pour la majeure partie (68 %) de l'érosion des sols par les cours d'eau (Georgopoulos et al., 2001), sauf si une source industrielle est présente (Nölte, 1988). La contamination de l'eau par le Cu provient aussi du sulfate de cuivre (13 %) utilisé comme fongicide en agriculture ; et des rejets d'eaux usées qui contiennent encore du cuivre, même après traitement (Bisson et al., 2005). Dans les écosystèmes aquatiques, la concentration en cuivre varie selon le compartiment et le lieu (Tableau 1.1). La concentration du cuivre dans les écosystèmes aquatiques est de 0,2 à 30 µg/L dans la colonne d'eau, bien que généralement <5 µg/L, et de 0,8 à 50 mg/kg poids sec dans les sédiments (Flemming & Trevors, 1989).

Le réseau de surveillance ROCCH a suivi la concentration du cuivre accumulée dans les moules et les huîtres pour la période 2003-2007 (Fig 1.3.3). Les résultats ont montré de fortes concentrations du cuivre sur tout le littoral Français avec l'importante contamination enregistré dans la Gironde (jusqu'à 7,26 fois la médiane nationale).

TABLE 1.1 – Concentration du cuivre dans différents compartiments et sites dans le monde

Compartiment	Concentrations	Lieu	Références
Huîtres	400 mg.kg-1 p.s	bassin d'Arcachon	(Ifremer, 2014)
Eau	5,4 µg /L	la baie de San Diego	(Dobalian, 2000)
Sédiments	3100 ppm	Mer rouge	(Miller et al., 1966)
Eau	1,5 µg/L		
Sédiments contaminés	97-978 ppm	La Havane	(González & Brüggmann, 1991)
sédiment non contaminés	4-29 ppm		
sédiments	46 ppm	Bassin Nord-Américain	(Chester et al., 1988)
Eau	0,11 à 0,51 ng/L	Nord du golfe de Gascogne	(Waeles et al., 2009)
Eau	<10 ng / L	Lagune de Venise	(Gieskes et al., 2015)

— Toxicité

Il est largement reconnu que la biodisponibilité du cuivre est fortement dépendante de son état d'oxydation et de sa forme chimique, qui est influencée par plusieurs facteurs physico-chimiques du milieu comme le pH, le carbone organique dissous (DOC) etc. . . (Erickson et al., 1996). L'ion libre est la forme la plus biodisponible capable de passer à travers les membranes biologiques où il peut alors induire des effets toxiques. Cependant, l'ion cuivre libre a une forte tendance à former des complexes avec les ligands organiques et inorganiques, ce qui se traduit par une diminution de la biodisponibilité et de la toxicité du cuivre. Dans le milieu marin côtier, une concentration élevée de ces deux ligands assure que l'ion cuivre libre ne représente qu'un faible pourcentage de la concentration totale dissous de cuivre dans l'eau de mer. Les données de toxicité du cuivre tirées de la base de données US EPA sont présentées dans la Figure 1.3.4. Selon ces données, les stades embryolairvaires de toutes les espèces marines sont les plus sensibles par rapport aux stades juvéniles et adultes. Dans certains cas, il y avait une différence d'environ 10-50 fois dans la toxicité du cuivre pour les stades précoces de développement par rapport aux stades adultes (ex : l'huître du Pacifique 12,1 et 560 µg/L respectivement). Les stades embryolairvaires de moule, huître et oursin se sont révélés être les plus sensibles avec des concentrations efficaces 50 % (CE50) de cuivre de 6,8 ; 12,1 et 14,3µg/L respectivement (Arnold et al., 2005).

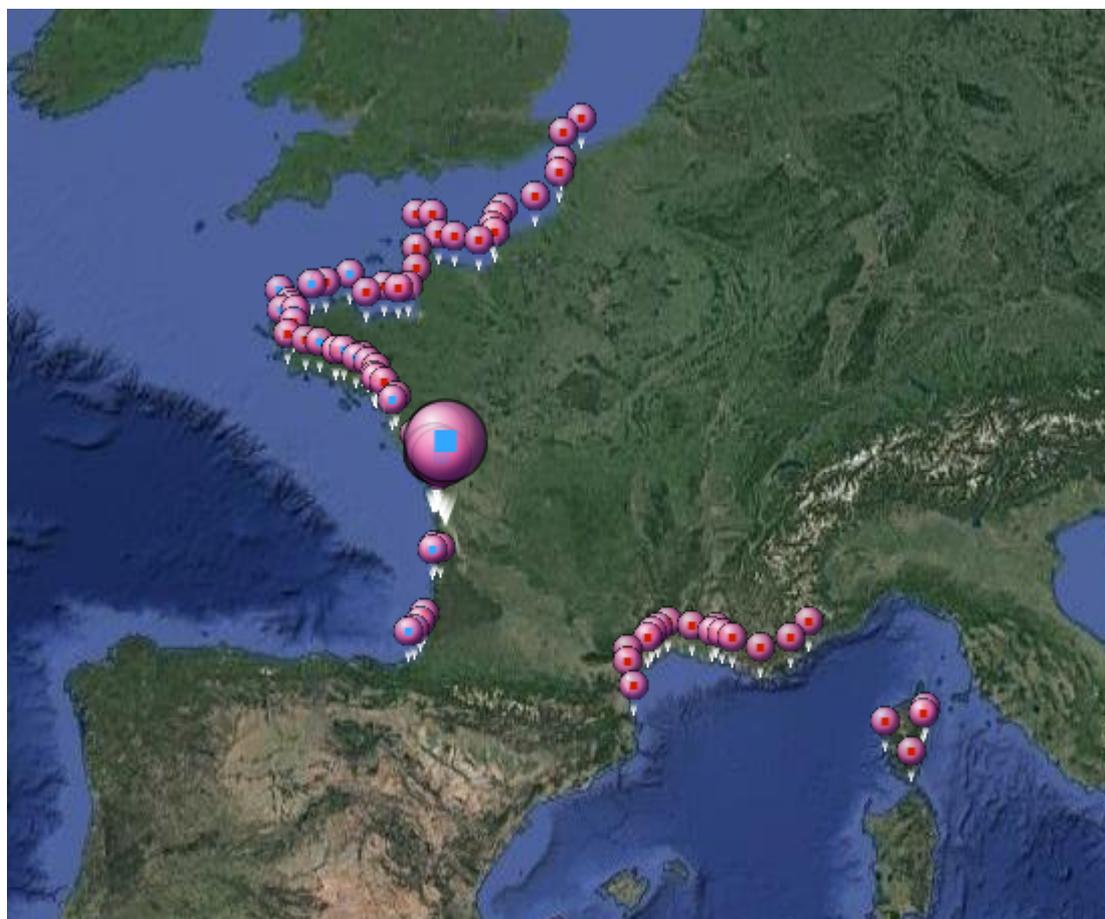


FIGURE 1.3.3 – Comparaison des médianes des concentrations du cuivre dans les huîtres (carré bleu) et les moules (carré rouge) du littoral français : atlantique et méditerrané. Résultats du réseau de surveillance ROCCH pour la période 2003-2007

(<http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/parammaps/contaminants-chimiques/>)

Il est généralement admis que la toxicité du cuivre est liée à deux principaux mécanismes de toxicité qui sont l'inhibition des enzymes et la génération d'un stress oxydant. En fait, les ions cuivre présentent une grande affinité pour les groupements thiol et amine présents dans plusieurs protéines, dont certains sont spécialisés dans le transport et le métabolisme du cuivre, évitant ainsi sa toxicité potentielle (Gumpu et al., 2015). Ce mécanisme peut toutefois être perturbé dans certaines conditions de surcharge en cuivre, ce qui entraîne sa liaison à des enzymes non impliqués dans le métabolisme du cuivre et connu pour être sensibles à une modification ou oxydation de leurs groupement thiol ; tel est le cas du cytochrome P450 et de la GSH-transférase (Letelier et al., 2005). L'action de l'ion Cu^{2+} inhibe l'enzyme Na^+/K^+ ATPase (Chowdhury et al., 2016). Le cuivre est considéré comme un agent cancérigène en raison de sa capacité à provoquer des dommages à l'ADN (Linder, 2012; Xu et al., 2016). L'exposition au cuivre augmente la production intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène (EROs) et favorise la libération de cytokine. En outre, l'ion Cu^{2+} est capable d'interagir avec les hydroperoxydes lipidiques formant ainsi la Malondialdéhyde et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) et provoquant des dommages tissulaires (Gumpu et al., 2015).

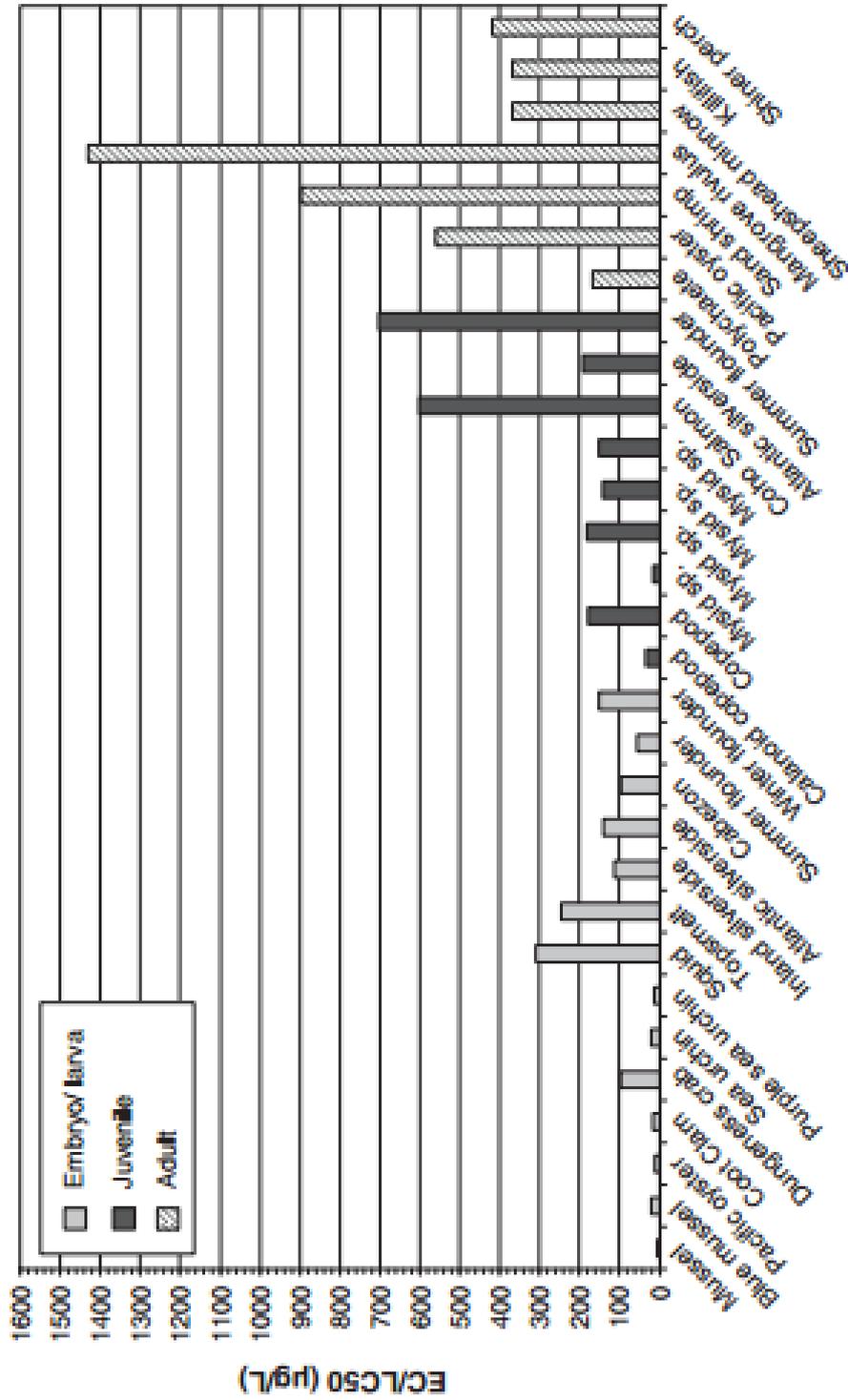


FIGURE 1.3.4 – Les données de toxicité du cuivre exprimées en CE50 ou la CL50 chez un groupe d'organismes marins à différents stades de vie. (Adoptée par S.J. Brooks and M. Waldock, 2009 à partir des données de la base des données de l'US-EPA (United States Environmental Protection Agencies) (<http://www.epa.gov/waterscience/criteria/copper/2003/index.htm>))

1.3.3.2 Métal toxique : l'Argent (Ag)

La pollution du milieu marin par l'argent est préoccupante, en particulier, avec l'utilisation croissante et rapide des nanoparticules d'argent dans les produits de consommation courantes (textiles, cosmétiques, bactéricides, . . .). L'argent est hautement toxique et connu pour sa bio-accumulation dans les organismes aquatiques. Cependant, les risques de l'argent pour l'écosystème marin est mal compris.

— *Identité, propriétés physiques et chimiques*

L'argent est un métal blanc et ductile existant naturellement sous forme pure et en minerais. Certains composés d'argent sont extrêmement photosensibles et sont stables dans l'air et dans l'eau, sauf s'ils sont exposés à des composés soufrés. L'argent métallique est insoluble dans l'eau, mais de nombreux sels d'argent, tels que le nitrate d'argent ($AgNO_3$), sont solubles. Dans le milieu naturel, l'argent se trouve principalement sous la forme de sulfure (Ag_2S) ou associé à d'autres sulfures métalliques, en particulier ceux du plomb, du cuivre, du fer et de l'or, qui sont tous essentiellement insolubles (ATSDR, 1990). L'argent est un métal rare (67^{ème} élément en abondance) naturellement présent dans la croûte terrestre (0,055 mg/kg; (Wedepohl, 1995)), qui possède deux isotopes stables ^{107}Ag et ^{109}Ag) et 48 radio-isotopes (Calmon et al., 2002) qui n'existent pas naturellement.

— *Sources*

La concentration d'argent dans l'eau est de 0,01 µg/L dans les zones non polluées et de 0,01 à 0,1 µg/L dans les zones urbaines et industrialisées. Des concentrations beaucoup plus élevées ont été trouvées dans l'eau de mer de la baie de Galveston, Etats-Unis (8,9 µg/L) et 260 µg/L près des décharges de déchets de fabrication photographique (Howe & Dobson, 2002). L'argent est bien connu pour ses nombreuses applications industrielles telles que la soudure, la conduction électrique et des applications de placage. En outre, ce métal est utilisé dans la fabrication des bijoux, des couverts, des pièces de monnaie, des instruments médicaux, biocide dans les produits domestiques et les matériaux photographiques (Howe & Dobson, 2002; Luoma, 2008). Dans les applications médicales, l'argent est inclus dans les pansements, les cathéters urinaires et d'autres dispositifs médicaux, en raison de la capacité des ions d'argent d'inhiber la croissance des bactéries et des champignons (Liau et al., 1997). Récemment, les nanoparticules d'Ag sont devenues couramment utilisées dans une large gamme de produits de consommation, y compris les machines à laver, les détergents, les vêtements, les emballages alimentaires, les conteneurs, les compléments alimentaires, les dispositifs médicaux, des plastiques et des réfrigérateurs en raison de ses propriétés antibactériennes (Behra et al., 2013; Savery et al., 2013). Connue depuis des millénaires, l'effet antimicrobien de l'argent ionique provient de sa capacité à générer des EROs permettant d'inactiver les enzymes microbiennes (Clement & Jarrett, 1994; Matsumura et al., 2003; Rai et al., 2009). Les propriétés antimicrobiennes de l'argent sont particulièrement

préoccupantes car par sa présence dans l'écosystème marin, il peut inhiber l'activité microbienne naturelle importante pour la décomposition et le recyclage de la matière organique et l'élimination des polluants (Savery et al., 2013).

Le réseau de surveillance ROCCH a suivi la concentration de l'argent accumulée dans les moules et les huitres pour la période 2003-2007 (Fig 1.3.5). Les plus fortes concentrations qui ont été enregistrées au niveau du littoral Nord et Ouest Cotentin présentent des médianes proches ou légèrement inférieures à la médiane nationale. des médianes de 15 à 30 fois supérieures à la médiane nationale ont été enregistrées à la Vaucottes, Antifer digue, Cap de la Hève et Villerville.



FIGURE 1.3.5 – : Comparaison des médianes des concentrations de l'argent dans les huîtres (carré bleu) et les moules (carré rouge) du littoral français : atlantique et méditerranéen. Résultats du réseau de surveillance ROCCH pour la période 2003-2007 (<http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/parammaps/contaminants-chimiques/>)

— **Toxicité**

L'Argent (Ag) est un polluant préoccupant en milieu aquatique en raison de sa toxicité, sa chimie et sa biodisponibilité (Luoma et al., 1995). L'argent ionique (Ag⁺) est l'un des trois métaux lourds les plus toxiques (avec Cu et Hg) (Bryan, 1984; Luoma et al., 1995) pour les espèces aquatiques même à de très faibles concentrations (Tableau 1.2). L'ion monovalent d'argent (Ag⁺) est considéré comme l'espèce d'argent la plus toxique dans les systèmes aquatique Ratte (1999) et il a été montré que sa toxicité est directement liée à son accumulation intracellulaire (Lee et al., 2005). L'argent est fortement bio-accumulé par un certain nombre d'espèces de phytoplancton marin, des macro-algues et des invertébrés (Bryan, 1984; Fisher et al., 1995). Il a été montré que même à des concentrations nominales (0,5 à 4,5 µg/L) l'accumulation de l'Ag était élevée dans la plupart des organismes exposés avec des effets négatifs sur la croissance des algues, palourdes, huîtres, escargots, daphnies, amphipodes, et truite. Bryan & Langston (1992) ont montré que les stades précoces de vie des mollusques bivalves semblent être les plus sensibles à l'Ag. Luoma (2008) a mis en évidence l'effet négatif de l'accumulation de l'argent sur la maturité sexuelle de la palourde *Corbula amurensis* (Figure 1.3.6). Parmi les différentes formes, le nitrate d'argent est le plus toxique en raison de sa dissolution facile dans l'eau (Mance, 1987).

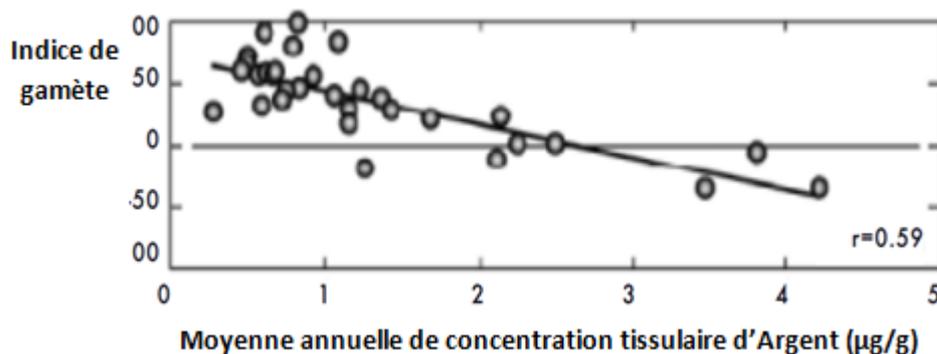


FIGURE 1.3.6 – Corrélation de l'indice de gamète (de la maturité sexuelle) avec des concentrations d'argent dans les tissus de la palourde, *Corbula amurensis*. 9 ans d'échantillonnage mensuel sur quatre sites (Luoma, 2008)

La toxicité de l'argent a été montrée chez les bactéries, le phytoplancton et les invertébrés (Bryan, 1984; Luoma et al., 1995; Ratte, 1999). Pour les invertébrés marins, les stades précoces de développement semblent être les plus sensibles. Il agit principalement en désactivant les enzymes Na⁺/K⁺ adénosine triphosphatase et l'anhydrase carbonique chez les animaux (Bielmyer et al., 2008; Morgan et al.,

2004), et par sa capacité d'interagir avec des groupes thiols dans les enzymes et les protéines de micro-organismes (McDonnell & Russell, 1999). Chez les poissons d'eau douce, la toxicité aigüe de l'argent se manifeste par l'inhibition de l'enzyme Na^+/K^+ ATPase des cellules branchiales. La perturbation de cette enzyme inhibe le transport actif des ions sodium et chlorure et, par conséquent, l'osmorégulation cellulaire (Webb & Wood, 1998; Wood et al., 1999) ainsi que l'augmentation de production et d'accumulation d'ammoniac provoquant une situation de stress aigu (Hogstrand & Wood, 1998). De plus, une hyperventilation a été observée chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* exposée à l'Ag ionique et ça été expliqué comme une façon pour lutter contre l'acidose métabolique (Webb & Wood, 1998). L'augmentation de la sécrétion de mucus après l'exposition à l'argent ionique a été constaté (Morgan et al., 2004). Quand une substance toxique irrite l'épithélium branchial, la production de mucus est augmentée pour permettre le piégeage et l'excrétion de la substance toxique des branchies (Handy & Shaw, 2007). Cependant, la sécrétion excessive de mucus augmente aussi la diffusion d'oxygène, compromettant ainsi la respiration (Smith et al., 2007). L'exposition à l'argent induit le stress oxydatif qui se traduit par la production du malonedihaldéhyde, la production des EROs (Jiang et al., 2012; Charehsaz et al., 2016) et l'accumulation des métallothionéines (Hogstrand et al., 1996).

TABLE 1.2 – Toxicité d'Argent ($\mu\text{g/L}$) sur les premiers stades de vie des différentes espèces aquatiques

Espèces	Concentration d'Ag ($\mu\text{g/L}$)	Paramètre de toxicité	Référence
<i>Spisula solidissima</i> : Embryon, 1h d'exposition	14	EC50	(Zoto & Robinson, 1985)
<i>Crassostrea gigas</i> : Embryon, larve	14	Concentration seuil	(Dinnel et al., 1983)
<i>Mytilus edulis</i> : Embryon, 72h	<4	Concentration seuil	(Dinnel et al., 1983)
<i>Crassostrea virginica</i> : Larve	25	LC50	(Calabrese et al., 1977)
<i>Mercenaria mercenaria</i> Larve	32	LC50	(Calabrese et al., 1977)
<i>Danio rerio</i> : Larve 6 jours post-fécondation	34	EC50	Ašmonaitė et al. (2016)
<i>Rana pipiens</i> embryon	10	EC50	Zuiderveen & Birge (1996)

1.4 La Méditerranée : un milieu en danger dans un contexte de changement global

La Méditerranée est une mer semi-fermée, avec une superficie de $2,5 \times 10^6$ Km^2 et 46000 km de côtes (Lionello et al., 2006). Elle est entourée de trois continents (Europe, Asie et Afrique), à l'ouest elle est ouverte sur l'océan atlantique par le détroit de Gibraltar (ouverture naturelle).

La faible ventilation et le temps de séjour relativement court de ses masses d'eau ~ 70 ans par rapport à 200-1000 ans pour les autres océans (Falkowski, 1998); rend la mer Méditerranée très réactive aux forçages externes. En outre, les perturbations naturelles interagissent avec les évolutions démographiques et économiques croissantes se produisant de manière hétérogène dans la zone côtière.

Avec une population estimée à 132 millions d'habitants qui augmente fortement au cours de la saison touristique estivale, les côtes méditerranéennes sont particulièrement soumises à des pressions humaines fortes (PNUE / PAM / Plan Bleu, 2009; Durrieu de Madron et al., 2011). La Méditerranée a été plus récemment présentée comme l'une des régions du monde présentant des problèmes environnementaux les plus graves (PNUE / PAM / Plan Bleu, 2009).

Dans ce contexte, plusieurs politiques et directives européennes concernées par les problèmes environnementaux des zones côtières ont été mises en place au cours de ces dernières années (Nobre, 2011). Parmi les plus importantes il y a la directive cadre sur l'eau (Directive 2000/60/EC, 2000), la recommandation de gestion intégrée des zones côtières (GIZC) (Recommandation 2002/413/EC, 2002), et la directive-cadre stratégie pour le milieu marin (Directive 2008/56/EC, 2008). En outre, plusieurs initiatives visant à identifier les sources et l'étendue de la contamination chimique de l'eau à partir de l'utilisation d'indicateurs biologiques ont été développés dans plusieurs zones côtières méditerranéennes. Jusqu'à récemment, ces initiatives ont toutefois principalement concerné la partie nord-ouest de la Méditerranée.

La mer Méditerranée a été identifiée comme un « hotspot » pour le changement climatique et ses effets très vulnérables (Nicholls & Hoozemans, 1996; Gambaiani et al., 2009; Durrieu de Madron et al., 2011). Dans la Méditerranée, le changement climatique devrait modifier la biodiversité et la reproduction des organismes résidents, provoquer la prolifération d'algues toxiques et la propagation d'espèces thermophiles (Gambaiani et al., 2009). Selon les modèles climatiques, le bassin méditerranéen sera l'une des régions les plus touchées par le réchauffement climatique (Vargas-Yáñez et al., 2010). En effet, les écosystèmes de la côte méditerranéenne sont gravement touchés par des perturbations majeures telles que : la destruction des habitats et l'introduction d'espèces exotiques, la surpêche, la pollution, l'urbanisation, etc... qui peut impacter la biodiversité et le fonctionnement des

écosystèmes. Le bassin méditerranéen est donc un centre d'intérêt pour la recherche sur les effets des changements climatiques.

La mer Méditerranée est un réceptacle de plusieurs types de contaminants chimiques, y compris les métaux lourds dont le cuivre et l'argent (les métaux modèles de cette étude). Les concentrations en cuivre en Méditerranée sont plus importantes que celle de l'argent. Les niveaux de concentration en cuivre dans les mollusques du réseau RINBIO (Le Réseau Intégrateurs Biologiques) montrent une forte homogénéité des données autour d'une valeur moyenne de 4 mg/kg poids sec à l'exception de plusieurs stations lagunaires (Bages Nord : 9,3 mg.kg⁻¹ p.s.) et de la rade de Toulon (6,5 mg/kg/ p.s.). Cependant, les niveaux de concentration d'Ag sont plus faibles : 0,03 (0,01 – 0,36) mg/kg chez *Mytilus spp* (RNO, 2006)

1.5 Modèle biologique : genre *Mytilus*

Les mollusques bivalves du genre *Mytilus* sont largement distribués dans le monde entier (Figure 1.5.1) (Gosling, 1992) ; leur position taxonomique a souvent été étudiée et discutée (Lubet, 1973) et maintenant elle est bien établie :

Règne : Animal
Sous règne : Métazoaires
Embranchement : Mollusques
Classe : Bivalves
Sous-classe : Ptériomorphes
Ordre : Mytiloidés
Famille : Mytilidés
Genre : *Mytilus*

Les moules du genre *Mytilus* constituent un modèle d'intérêt en toxicologie environnementale (Rittschof & McClellan-Green, 2005). Elles sont largement utilisées en écologie des eaux côtières par plusieurs programmes de bio-surveillance tel que le Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du littoral (ROCCH) en France et le Mussel Watch projet aux États-Unis (WADE et al., 1998). Outre leur importance écologique et économique, ce genre a acquis un rôle important comme bio-indicateur en raison de leur mode de vie sessile euryalin, et leur alimentation microphage qui les conduit à filtrer l'eau et à accumuler les contaminants (Pruell et al., 1986). De plus, elles présentent une large répartition géographique, une grande tolérance à différents stress. En outre, il est possible de travailler sur différentes classes d'âge. En outre, les connaissances acquises sur sa biochimie et sa physiologie, permettent à présent d'interpréter raisonnablement les réponses des bio-marqueurs afin d'estimer les menaces sur des organismes (Depledge & Fossi,

1994) ce qui les rend particulièrement intéressants pour la bio-surveillance de la pollution (Serafim et al., 2011; Marigómez et al., 2013).

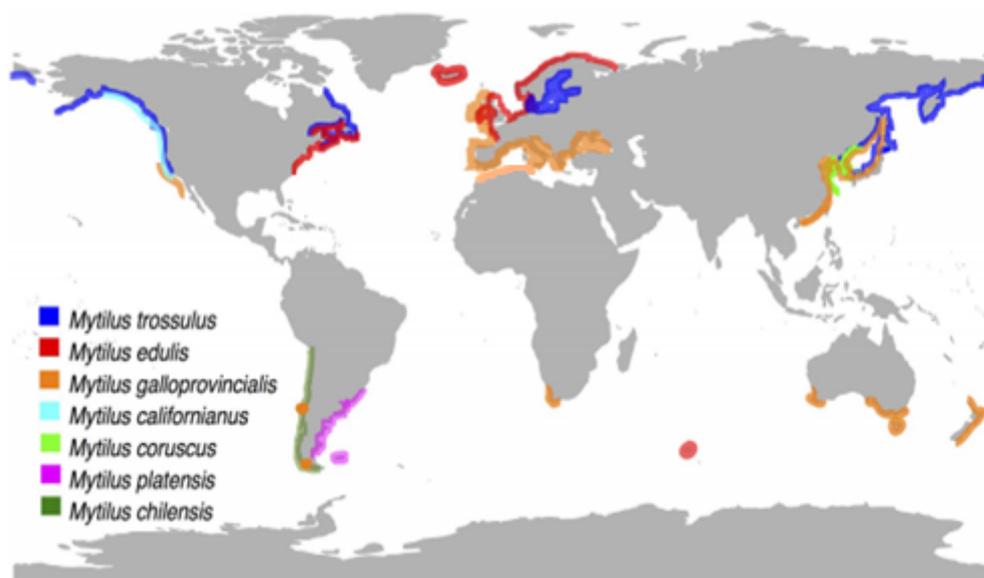


FIGURE 1.5.1 – Distributions mondiales approximatives de moules de genre *Mytilus* (Gaitán-Espitia et al., 2016) (modifié)

Les deux espèces les plus représentées sont la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) et la moule bleue *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758). La première est une espèce d'eau chaude et occupe principalement la Méditerranée et se prolonge vers le nord jusqu'à la côte de la France et le Royaume-Uni (Skibinski et al., 1983; McDonald et al., 1991; Gosling, 1992). La seconde est une espèce occupant les régions tempérées et froides le long des côtes atlantiques européennes : de l'Europe du Nord à la frontière française / espagnole dans le golfe de Gascogne (Hilbish et al., 2012).

Le chevauchement des zones de répartition de deux espèces sœurs a créé une zone hybride mosaïque, avec une alternance de populations hybrides et de populations parentales pures du Golfe de Gascogne au nord de l'Écosse (Coustau et al., 1991; Bierne et al., 2003; Hilbish et al., 2012). Cette zone est assez vaste, couvrant plus de 1400 km de côtes, et les populations de moules dans cette zone contiennent des rétro-croisements et d'autres génotypes introgressés qui sont produits par plusieurs générations d'hybridation (Gosling, 1992). Les zones hybrides sont souvent considérées comme des fenêtres sur le processus de spéciation (Harrison, 1990).

L'hybridation naturelle peut avoir plusieurs conséquences, y compris la formation d'espèces hybrides adaptées aux nouveaux écotones et le renforcement des barrières reproductives (Arnold, 1992).

1.5.1 Reproduction :

1.5.1.1 Sexualité :

A l'exception de quelques cas rares d'hermaphrodisme (1/1000), les moules *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* sont des espèces gonochoriques sans dimorphisme sexuel et la plupart des populations contiennent un nombre égal en mâles et femelles (Gosling, 1992). La couleur des gonades est typiquement orangeâtre chez la femelle et blanc-crèmeuse chez le mâle. Après une ponte récente, les gonades deviennent minces et transparentes, souvent avec des taches brunes-rougeâtres.

Chez les moules, la maturité sexuelle intervient au bout d'un an. Chez ces espèces, l'appareil reproducteur est formé simplement par les gonades (ce qui facilite le changement de sexe) qui ne sont pas anatomiquement distinctes ; elles sont formées d'acini envahissant la masse viscérale et le manteau et comprenant des gamètes mâles ou femelles.

1.5.1.2 Gamétogenèse et cycle sexuel :

La gamétogenèse chez les moules suit 4 étapes principales :

1. **Stade 0** : correspond au repos sexuel et à la régénération qui commence dès la fin d'émission des gamètes. Caractérisé par l'absence de follicules et l'accumulation des réserves (glucides, lipides). Il n'existe que quelques cellules mères (oogonies et spermatogonies) au niveau de la paroi folliculaire, qui donneront naissance à des gonies primaires qui s'accumulent à l'intérieur des acini gonadiques. Cette période diffère selon l'habitat de l'espèce mais généralement le repos coïncide avec les périodes chaudes (juillet-août).
2. **Stade 1** : correspond à la multiplication des gonies pour donner des oogonies ou des spermatogonies. A la fin de cette période, le manteau est donc envahi par des nombreux follicules avec un aspect moins homogène.
3. **Stade 2** : correspond à l'ovogenèse et la spermatogenèse. Les follicules sont de plus en plus apparents ; le manteau prend une teinte propre à chaque sexe : rouge-orangée pour les femelles et blanc crèmeux pour les mâles. Les ovules et les spermatozoïdes sont encore immatures.
4. **Stade 3** : correspond à la maturité sexuelle. Les gamètes sont prêts à être émis. Les moules peuvent vider leur gonade en une ou plusieurs fois.

Le stade 1 commence généralement en octobre ou novembre, la gamétogenèse se produit tout au long de l'hiver et c'est vers le début de printemps que les gonades de la plupart des moules sont morphologiquement matures. C'est pendant les mois de printemps qu'il y aura une période de ponte partielle suivie par une période de gamétogenèse rapide jusqu'au début de l'été où les gonades sont à nouveau à pleine maturité. Cette deuxième période de gamétogenèse est plus évidente chez les moules résidant dans un habitat avec des conditions d'alimentation favorables (Gosling, 1992). En outre, une ponte moins importante et moins intense peut se produire durant l'été (Banni et al., 2011; Gosling, 1992).

Les cycles sexuels sont sous l'influence des facteurs internes, génétiques, endocriniens et métaboliques qui peuvent influencer le bon déroulement de la gamétogenèse (Seed, 1969; SUÁREZ et al., 2005) et des facteurs externes tels que les facteurs climatiques, hydrologiques et nutritionnels. La température et la nourriture sont les principaux facteurs exogènes qui contrôlent et régulent la durée et la synchronisation du cycle de reproduction de la moule (Gray et al., 1997; Lemaire et al., 2006). En fait, les variations saisonnières et latitudinales de la température jouent un rôle déterminant sur le cycle sexuel. Chez les espèces où la ponte se produit au printemps ou en été, la durée de la gamétogenèse est conditionnée par les températures hivernales (pontes plus précoces à l'issue d'hivers peu rigoureux) (His & Cantin, 1995). La formation des gamètes chez les moules de genre *Mytilus* n'est pas inhibé par les températures basses. Chez *M. edulis* par exemple, espèce à repos sexuel estival, la gamétogenèse peut s'effectuer à 7 ou 8 °C et une température de 18°C l'arrête. La salinité et les apports nutritionnels jouent aussi un rôle important dans le développement des gonades (His & Cantin, 1995).

1.5.1.3 Émission des gamètes et fécondation :

À la fin de la gamétogenèse, les gamètes (ovules et spermatozoïdes) sont matures et prêts à être émis dans l'eau. L'émission nécessite l'intervention d'un stimulus exogène (chimique, thermique...) provoquant ainsi la ponte des femelles ou l'éjaculation des mâles. Les fluctuations de la température (hausse et baisse) ont été rapportées comme stimulant la ponte chez *Mytilus* (Gosling, 1992). La température de l'eau est un facteur déterminant pour le déclenchement de la ponte (Jorgensen et al., 1990; Davoren et al., 2012). Les basses températures ont une action inhibitrice sur l'émission des gamètes; par exemple chez la moule méditerranéenne les pontes sont rarement observées à 13-14° C, et aucune émission n'est possible entre 2 et 6° C. Par contre, des pontes ont pu être obtenues à des températures supérieures à 20° C.

La ponte des ovules se fait par contraction musculaire et sous forme de cordonnet orangé qui se désagrège rapidement dans l'eau sous l'influence des courants. L'éjaculation des spermatozoïdes se produit sous forme d'un mince filet blanc continu

et ne nécessite aucun mouvement valvaire particulier. La relaxation du muscle adducteur est provoquée par une substance présente dans le sperme, la diantine (His & Cantin, 1995). Les moules produisent un grand nombre d'ovules (jusqu'à 8×10^6 œufs) (Bayne et al., 1978) mais de petite taille (70 – 80 μm).

La fécondation chez les moules est externe et se produit dans le milieu naturel, dans les premières minutes après la rencontre de l'ovocyte et du spermatozoïde. Après, il y aura une succession de divisions cellulaires. En laboratoire, les divisions sont observables sous microscope et l'apparition de globule polaire indique le succès de la fécondation (FAO, 2015).

1.5.1.4 Cycle de vie :

Des études ont montré qu'il n'y a pas de différences entre le cycle de vie de la moule *M. edulis* et celui de la moule *M. galloprovincialis* (Lubet, 1973) (Figure 1.5.2)

- Phase embryonnaire

La fécondation est marquée par l'expulsion de deux globules polaires (suite à la méiose), qui initie le début de la division cellulaire (50 à 80 minutes après la fécondation). Chez les moules, la segmentation est de type spirale. Après environ 6 heures, des cils apparaissent et l'embryon commence à se déplacer en tournant doucement.

- Phase larvaire :

• Larve trochophore :

Ce stade est le premier stade larvaire, abouti environ vingt-quatre heures après la fertilisation. La larve trochophore est couverte de cils apicaux et possède un flagellum, lui permettant de se déplacer autour d'elle-même. Une glande coquillère se développe à partir de l'ectoderme dorsal et sécrète une petite coquille transparente.

• Stade véligère :

Appelée aussi Prodissoconque 1 ou Stade Larve-D (Bayne, 1965) car la larve prend la forme d'un « D » bien formé. Ce stade est atteint 48 heures après la fécondation. La larve a augmenté de taille et son flagellum est encore visible. L'intestin commence à fonctionner marquant ainsi le passage de la phase endotrophe (utilisation des réserves vitellines), à la phase exotrophe (capture de nourriture). La formation de la coquille est terminée le troisième jour. La larve-D se déplace grâce à un vélum (organe locomoteur pourvu de cils vibratiles)

• Stade umbo-veligère :

Une deuxième coquille apparaît (Prodissoconque 2) et l'umbo (ou crochet : la zone de la coquille située près de la charnière) commence à se former généralement vers le dixième jours et la larve atteint environ 240 μm . Elle mène une vie pélagique active grâce à son vélum qui est bien développé. Une tache oculaire photosensible est formée au bout de 17 - 18 jours après la fécondation.

- Stade pédivéligère :

Le stade pédivéligère (Carriker, 1961) est abouti à 22-24 jours après la fécondation. Il est caractérisé par la présence d'un pied bien développé et fonctionnel. La larve devient plus lourde et mesure 270-300 μm ce qui la rend moins active mais elle peut mener une vie pélagique en nageant au-dessus du substrat ou benthique en rampant sur celui-ci.

- **Métamorphose** :

Le développement larvaire d'une moule peut durer jusqu'à 35 jours en fonction des conditions environnementales, avant de trouver un substrat naturel pour se fixer et passer de la vie pélagique à la vie benthique. La fixation sur le support peut comporter plusieurs tentatives. Une fois le substrat définitif trouvé, la larve se métamorphose et il s'agit d'un phénomène irréversible. La métamorphose est caractérisée par la dégénérescence de vélum, l'apparition des ébauches branchiales, l'allongement du pied, la coquille devient oblique avec un crochet bien visible et commence à s'organiser. Il s'agit du stade de larve plantigrade (Carriker, 1961) qui mesure 480 à 500 μm .

- **Phase juvénile** :

C'est le stade des naissains qui ressemble à l'adulte avec tous les organes en place à l'exception de la gonade. Lorsqu'elle atteint 1 à 2 mm, la jeune moule se détache de son substrat d'origine (ex : algue). Les moules sont encore capables de se déplacer pour trouver un substrat favorable pour se fixer dans des fissures protégées (Le Gall, 1969). Chez les moules, la maturité sexuelle intervient au bout d'un an.

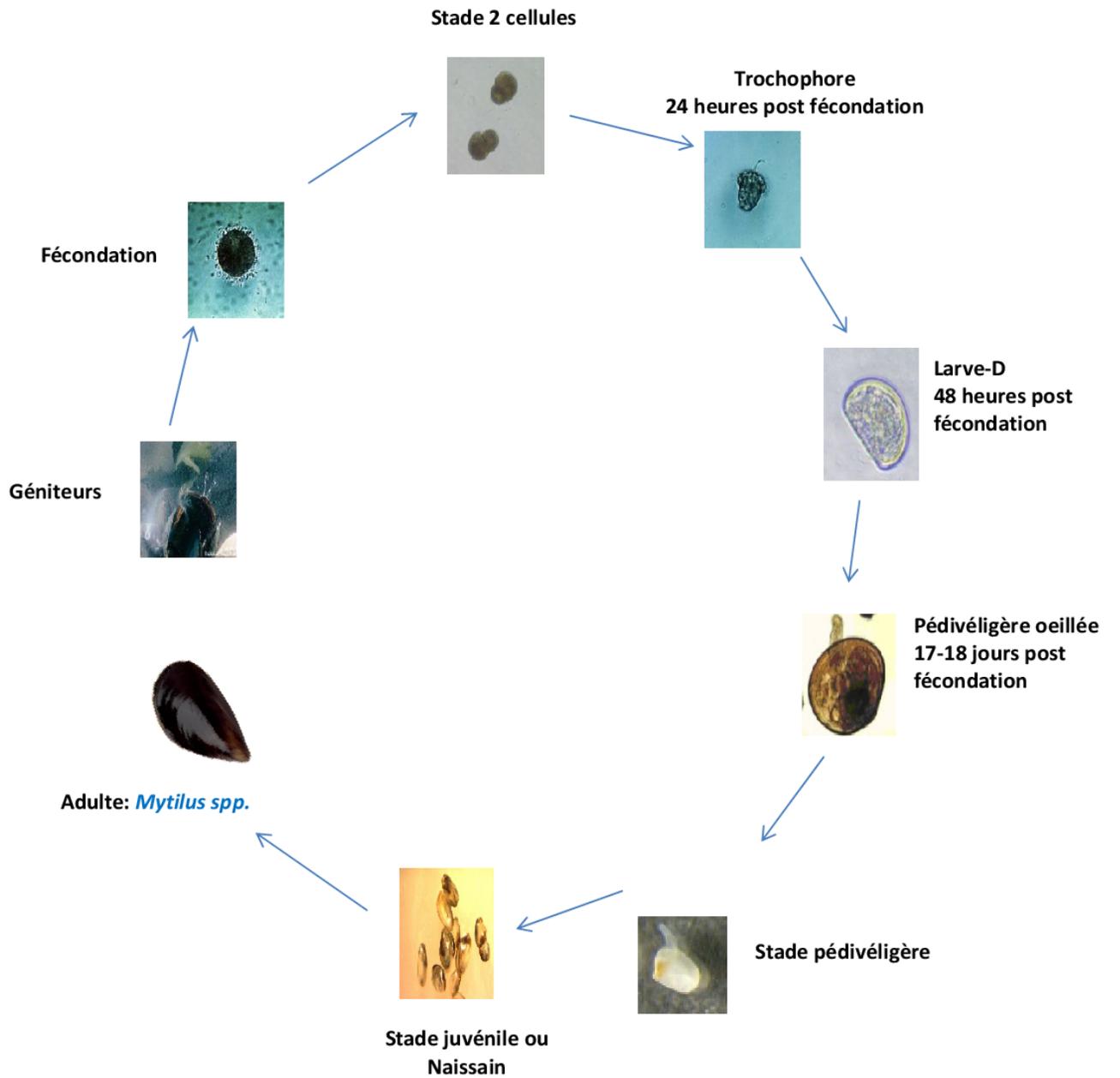


FIGURE 1.5.2 – Cycle de vie de la moule *Mytilus* spp.

1.6 Contamination des mollusques bivalves

Les invertébrés aquatiques, en particulier les mollusques bivalves accumulent les métaux traces, essentiels ou non, à différentes concentrations dans leurs tissus et organes (Eisler, 1988). Il a été noté que des organismes résidant dans le même habitat pourraient accumuler des concentrations très différentes de métaux traces (Hare et al., 1994; Philips & Rainbow, 1994), même des espèces du même genre (Moore & Rainbow, 1987). Ayling (1974) suggère différents mécanismes d'absorption de Cu, Cr, Zn et Cd par l'huître creuse *Crassostrea gigas*. L'huître du pacifique *Crassostrea virginica* exposée au cadmium accumule rapidement des niveaux élevés du métal dans les tissus mous. Les concentrations maximales de Cd apparaissent indépendantes des concentrations d'exposition (Daskalakis, 1996). En fait, l'importance de quantité accumulée dépend du tissu, de l'espèce, du stade de vie en question et des conditions du milieu et donc de la biodisponibilité du produit (Jakimska et al., 2011). Ainsi, une concentration de métal accumulée qui est anormalement élevée pour une espèce peut être considérée comme très faible pour une autre.

Les mollusques bivalves se contaminent en métaux, soit du milieu aquatique environnant soit à partir de la nourriture. La proportion relative de chaque voie de contamination varie selon le type d'invertébré et les biodisponibilités relatives du métal dans l'eau et l'alimentation (Wang & Fisher, 1999). La destination finale du métal dépend en particulier de la physiologie de l'invertébré et du devenir dans l'organisme à savoir s'il est utilisé dans une fonction métabolique essentielle, excrété, stocké dans le corps ou lié à des biomolécules et donc s'il exerce un effet toxique. Les métaux ont généralement une affinité pour le soufre et/ou l'azote et ils sont susceptibles de se lier aux bio-molécules qui les contiennent (Nieboer & Richardson, 1980). De telles affinités font que les métaux, potentiellement toxiques, empêchent les protéines ou autres molécules d'assurer leurs fonctions métaboliques normales. Ainsi, dans la cellule, un métal est «métaboliquement disponible», au moins jusqu'à ce que l'invertébré puisse l'excréter et/ou le détoxifier (Mason & Jenkins, 1995). La détoxification des métaux implique souvent la liaison à des protéines de haute affinité aux métaux telles que les métallothionéines (Mts) (Viarengo, 1989; Mason & Jenkins, 1995; Amiard et al., 2006). Les Mts séquestrent les métaux, réduisent leur biodisponibilité intracellulaire et forment des complexes Métal-Mts. Le devenir de ces derniers est soit une incorporation et accumulation dans le système lysosomal qui les dégrade (Viarengo, 1989) soit dans les granules insolubles intracellulaires (Amiard et al., 2006). Les organismes vivants naturellement exposés à des concentrations élevées de métaux peuvent s'adapter jusqu'à un certain niveau en réduisant leur filtration, et en augmentant leur excrétion et/ou la séquestration.

1.7 Mécanismes d'adaptation des bivalves face aux stress environnementaux

1.7.1 Notion de stress :

La plupart des organismes (à l'exception notable de ceux résidant dans les environnements très stables tels que les profondeurs marines) vivent dans un environnement instable et dynamique où plusieurs facteurs peuvent changer rapidement et simultanément. Ces fluctuations de l'environnement naturel se superposent, et interagissent entre elles, y compris la pollution, la destruction de l'habitat, l'acidification des océans et le changement climatique mondial. Quand un ou plusieurs facteurs environnementaux s'éloignent des gammes de tolérance des espèces, cela peut conduire à des perturbations physiologiques qui peuvent être à l'origine d'un stress (Hoffmann & Hercus, 2000).

La définition du stress et de ces facteurs a une histoire longue et controversée. Wendelaar Bonga (1997) a défini le stress comme un état dans lequel l'équilibre dynamique des organismes vivants, appelé homéostasie, est menacé ou perturbé par des stimuli intrinsèques ou extrinsèques, communément défini comme facteurs de stress. Ces réponses impliquent généralement tous les niveaux de l'organisation animale et sont désignés sous le nom de « réponse intégrée au stress » (Wendelaar Bonga, 1997). Dans ce contexte, le stress acquiert une connotation moins négative, dans la mesure où il indique toutes les forces ou les stimuli de l'environnement, interne ou externe, qui peuvent induire des changements et des adaptations de la physiologie et de comportement de l'organisme pour l'aider à mieux survivre dans son environnement.

1.7.2 Les Bivalves et le stress :

L'intégration des effets des facteurs de stress multiples et la prédiction de leurs conséquences pour la survie et la distribution des espèces est un problème important en écophysiologie.

Les organismes vivants ont développé une variété de stratégies pour répondre aux changements environnementaux. Les réactions utilisées pour maintenir l'homéostasie cellulaire sous conditions de stress sont souvent comportementales, métaboliques ou physiologiques. En raison de leur immobilité, les organismes sessiles en particulier comptent sur la plasticité physiologique (ex : régulation de l'expression génique) pour s'adapter aux agressions environnementales et coloniser rapidement des habitats fluctuants (Fabbri et al., 2008). Toutefois, si le stress ou les facteurs de stress persistent sans adaptation physiologique possible, les effets sublétaux ou même la mort peuvent survenir.

Chez les ectothermes, la dépendance thermique est très forte du fait de l'absence de régulation de leur température corporelle. Cette forte dépendance thermique rend les ectothermes très sensibles aux facteurs abiotiques. Les bivalves sont l'un des meilleurs exemples d'ectothermes subissant des conditions très stressantes, notamment les variations naturelles de la température, de la salinité et de la disponibilité de l'oxygène aggravées par la présence importante de polluants et de perturbations anthropiques en général (Hofmann, 1999). Certaines populations vivant à leur limite de stress physiologique seront affectées par la hausse continue de la température prévue dans les différents scénarios de changement climatique, et seulement celles qui possèdent des mécanismes de défense suffisants seront en mesure de survivre.

1.7.3 Mécanismes d'adaptation :

Les recherches en écophysiologie visent à relier les processus physiologiques internes des organismes avec les facteurs environnementaux qui contrôlent ces processus afin de comprendre la distribution des espèces et des populations. Les réponses adaptatives au réchauffement climatique, affectent tous les niveaux biologiques. Elles apparaissent en premier lieu au niveau cellulaire et individuel, mais sont ensuite intégrées et traduites à des niveaux supérieurs. La capacité d'un organisme à rester actif dans des conditions extrêmes est une composante importante (Volker Loeschcke & Ary A. Hoffmann, 2015). Par conséquent, la détermination des limites d'activité est une première étape importante dans la compréhension des façons dont la variation environnementale affecte la condition physique et la dynamique d'une population donnée. Les limites thermiques ont reçu beaucoup d'attention parce que leur étude donne un aperçu de la façon dont le climat forme la variation de l'écologie, de la distribution et de l'évolution des espèces (Chown & Terblanche, 2006). De plus, les limites supérieures de température sont positivement liées à des températures de performance optimales (Huey & Bennett, 1987). En outre, le réchauffement accroît souvent les effets des polluants. Comme la température influe sur tous les types de processus physiologiques, une interaction entre la température et les substances toxiques est facilement prévisible quand ils agissent sur ces processus. Des études sur des espèces d'invertébrés marins ont proposé le concept de la tolérance thermique (Pörtner & Knust, 2007) pour expliquer le mécanisme qui régule les deux fenêtres de la thermotolérance et des valeurs thermiques optimales des animaux. L'adaptation à la variabilité thermique implique des ajustements de la capacité fonctionnelle en général et, plus particulièrement, des composantes du métabolisme aérobie et de la capacité d'alimentation en oxygène.

D'autres paramètres physiologiques sont modifiés, par exemple l'induction des protéines de protection contre le stress thermique ou de ses conséquences, telles

que le stress oxydatif. En effet, les animaux mettent en place une réponse au stress, et déplacent l'énergie, normalement allouée à la croissance et à la reproduction, pour la synthèse des protéines de stress à savoir les protéines de choc thermique (Piano et al., 2002; Fabbri et al., 2008), ou les activités enzymatiques impliquées notamment dans les défenses anti-oxydantes. La réponse des protéines de choc thermique est parmi les voies physiologiques les plus étudiées en réponse aux changements globaux (Somero, 2012). Les mécanismes d'élimination et de détoxification ont tendance à augmenter avec l'augmentation de la température. Cependant, l'augmentation de la toxicité avec l'augmentation de la température a été déjà largement documentée (Khan et al., 2006, 2007; Kuz'mina & Ushakova, 2007; Sokolova & Lannig, 2008).

Cependant, dans le milieu naturel, les cycles saisonniers sont un facteur déterminant de la physiologie des invertébrés (croissance, reproduction, immunité). Les changements dans les facteurs environnementaux résultant de changements saisonniers peuvent donc affecter fortement les activités métaboliques normales des bivalves (Banni et al., 2011). Le métabolisme est une des cibles majeures pour les effets du stress thermique et des métaux toxiques, en raison du rôle clé de l'équilibre énergétique dans l'adaptation au stress (SIBLY & CALOW, 1989). En situation de stress, les bivalves adoptent un métabolisme anaérobie, combiné avec des mécanismes de protection moléculaire, permettrait ainsi aux animaux pour survivre des périodes temporaires d'exposition à les températures extrêmes (Pörtner et al., 2007). L'augmentation des taux métaboliques chez les ectothermes avec l'augmentation de la température est une contrainte supplémentaire au bon fonctionnement de l'organisme : fournir suffisamment d'oxygène aux cellules, assurer les processus métaboliques, et éliminer les produits finaux métaboliques, notamment celles qui affectent le sang cellulaire et le pH. Les interactions température-disponibilité de l'oxygène dans l'eau, et la performance circulatoire illustrent les situations de multi-stress auxquels sont confrontées les espèces marines soumises du changement global.

1.8 Les tests embryo-larvaires de toxicité des bivalves :

Les bivalves, comme plusieurs autres invertébrés aquatiques, sont utilisés dans les programmes de bio-surveillance et l'évaluation de la toxicité des substances présentes dans les milieux aquatiques. Généralement, ces études nécessitent une quantité importante de données toxicologiques afin d'avoir des données fiables et robustes ce qui nécessitera, bien évidemment, l'utilisation et le sacrifice d'un nombre important d'organisme adultes ; ce qui est en contradiction avec la nouvelle

règlementation européenne sur l'expérimentation animale (Directive 2010/63/UE, 2010). L'objectif de cette dernière est la réduction d'une manière conséquente de l'utilisation des animaux en expérimentation animale en développant des tests alternatifs sur des cellules ou des embryons (Directive 2010/63/UE, 2010). C'est dans ce cadre que les tests embryo-larvaire de toxicité des bivalves sont proposés comme une alternative potentielle à certaines procédures utilisant des individus adultes tout en restant pertinent dans le cadre de l'évaluation de la toxicité des substances chimiques préoccupantes.

1.8.1 Sensibilité des stades précoces de développement des invertébrés aquatiques :

Il a été mis en évidence que les stades précoces de développement d'un organisme, sont beaucoup plus sensibles aux polluants par rapport aux juvéniles ou adultes (Beiras & His, 1995; His et al., 1999a). Par conséquent, les gamètes, les embryons et les larves représentent des stades critiques de vie et de bons modèles pour les tests de toxicité (Giesy & Graney, 1989). Cette hypersensibilité est d'une importance particulière pour les premiers stades de vie de nombreux invertébrés aquatiques et marins. Tandis que la plupart des vertébrés peuvent compter sur la protection parentale en passant ce moment critique du développement à l'intérieur d'un œuf ou l'utérus de la mère, de nombreux gamètes, embryons et larves d'invertébrés aquatiques et marins sont libérés dans le milieu dès l'émission des gamètes (Hamdoun & Epel, 2007). Les invertébrés aquatiques sont souvent des géniteurs diffuseurs, ce qui signifie qu'ils libèrent des millions de gamètes dans la colonne d'eau où la fécondation externe se produit alors (Marshall, 2006). Par conséquent, les gamètes, les embryons et les stades larvaires sont directement et très précocement exposés à un mélange de produits chimiques présent dans l'eau (Epel, 2003). Comme de nombreux invertébrés aquatiques qui se développent dans les écosystèmes côtiers, la probabilité d'une exposition des gamètes et des stades précoces de vie est élevée en raison de la présence de nombreuses sources de rejets ponctuels de polluants dans l'eau, les effluents d'eaux usées ou de déchets industriels (Boulangier et al., 2005), en plus des sources diffuses, telles que les eaux pluviales et le drainage agricole (Weston et al., 2009). Bien que les embryons soient caractérisés par un niveau élevé de défenses cellulaires, fournie par la femelle dans l'ovule avant la fécondation, ces défenses cellulaires sont très probablement insuffisantes pour se protéger contre toutes les agressions physico-chimiques et chimiques (Hamdoun & Epel, 2007). L'exposition survenant au cours de cette période de développement peut être particulièrement préjudiciable, car au cours de ces premiers stades de vie, les principaux processus d'ontogenèse se mettent en place (Gilbert, 2003). Si les cellules sont endommagées au cours de cette période, il y aura des risques que le dé-

veloppement, la croissance, la survie et la reproduction de l'organisme soient altéré (Burrue et al., 2014). Ceci est d'une importance particulière pour les organismes qui utilisent un modèle de développement en mosaïque, tels que les mollusques. Dans ces embryons d'invertébrés, le destin de chaque cellule est prédéterminé. Si l'une des cellules est endommagée, une autre cellule ne sera pas en mesure de remplacer celle endommagée (Davidson, 1991). Il a été montré qu'une cellule éliminée à cette étape peut conduire à un développement embryonnaire anormal (Burrue et al., 2014). Ainsi, si les cellules endommagées sont fondamentales pour les capacités de reproduction de l'organisme, les effets à long terme pourraient se manifester par une perturbation de la fécondité.

1.8.2 Applications en écotoxicologie

En raison de la complexité des interactions physico-chimiques entre les polluants et l'environnement marin, la toxicité potentielle des contaminants ne peut être évaluée de manière adéquate que par des essais biologiques avec des organismes vivants. D'un point de vue pratique, un essai biologique doit être sensible et scientifiquement valide, donner des résultats rapides à un coût modéré, et l'organisme en question doit être facilement accessible et sensible (His et al., 1999a).

Les bio-essais écotoxicologiques avec les larves et les embryons de bivalves remplissent ces critères mieux que la plupart des autres tests. Ces dernières décennies, ils sont de plus en plus couramment utilisés pour la toxicité et les effets biologiques des produits chimiques purs, et pour déterminer la qualité des effluents, des eaux et des sédiments. Il ne semble pas y avoir de très grandes différences entre les espèces de bivalves en ce qui concerne la sensibilité des larves aux substances toxiques (His et al., 1999a; Milam et al., 2005). Les principales espèces d'invertébrés utilisés pour les tests de toxicité aigüe sont les huîtres (*Crassostrea gigas* et *C. virginica*) et les moules (*Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis*).

Le test embryo-larvaire de toxicité chez les bivalves, encore appelé test d'embryotoxicité, dérivé de la norme ASTM E 724-89. Il a été proposé à l'AFNOR début 2006 selon le protocole décrit par Quiniou et al. (2005), et a été normalisé depuis 2009 (AFNOR, 2009). Ces tests sont particulièrement utiles à des fins de surveillance de la toxicité en milieu marin, car ils nécessitent un temps d'exposition relativement court (24 à 48 heures après la fécondation) et sont sensibles. Ce test est basé sur le pourcentage de larves en forme de D normales obtenues à la fin de l'embryogenèse. Les premiers travaux ont été menés par Calabrese & Davis (1967), et bien d'autres depuis.

Des expériences de plus longue durée, en fonction de l'évaluation de la croissance larvaire, ont également été menées afin d'étudier les effets des concentrations de micro-polluants sublétales (His & Robert, 1981; Watling, 1982). Ce type d'études représente une meilleure simulation des conditions qui prévalent dans le milieu

naturel, mais ils nécessitent également la culture des algues pour nourrir les larves au cours de l'expérience, qui peut durer plusieurs jours ou plusieurs semaines si elle est poursuivie jusqu'à la fin de l'étape de la vie pélagique.

Enfin, des travaux ont mis l'accent sur l'utilisation de larves âgées de plusieurs jours, afin d'étudier les effets des polluants sur le stade pédivéligère et sur la métamorphose, parce que ces étapes sont considérées comme particulièrement sensibles (Watling, 1983; Sheffrin et al., 1984; Beiras & His, 1995). La plupart des essais biologiques avec des embryons et larves de bivalves ont été réalisées avec différentes espèces d'huîtres, et de façon moindre avec des moules.

1.9 Les biomarqueurs :

Les biomarqueurs pourraient se définir comme des variations au niveau biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental dans les tissus, les fluides corporels ou l'organisme entier qui offrent un système d'alerte précoce efficace dans la bio-surveillance des milieux (Regoli et al., 2000, 2002; Lam & Gray, 2003; Bocchetti et al., 2008; Regoli et al., 2011).

1.9.1 Transcriptomique :

L'action de stress environnementaux sur un organisme peut affecter les niveaux d'expression des gènes. La comparaison des réponses transcriptomiques entre les populations naturelles présentes en sites pollués et non pollués (de référence) pourrait être particulièrement pertinente pour détecter l'évolution récente des systèmes contaminés (Whitehead et al., 2010; Bozinovic & Oleksiak, 2011). En plus, les études des mécanismes de toxicité ou de tolérance des polluants soulignent la valeur de la transcriptomique comparative pour explorer les différences d'adaptation chez les populations.

Les bivalves, comme tout organisme eucaryote, ont développé des mécanismes de détection sophistiqués et des systèmes de transduction du signal qui peuvent produire des résultats dynamique et spécifique en réponse à des contraintes. Lors d'un stress, les voies de signalisation intracellulaires qui contrôlent presque tous les aspects de la physiologie cellulaire sont activés. La régulation de l'expression génique est une composante majeure de la réponse au stress. Les approches de Toxicogénomique en utilisant les outils de la biologie moléculaire permettent de comprendre un nouvel aspect des impacts des contaminants chimiques sur les organismes vivants. Le niveau d'expression génique peut être évalué par la mesure du taux de transcription de ces gènes, ce qui peut affecter, directement ou indirectement les processus de détoxification et /ou de résistance et d'adaptation. Lorsque les gènes liés à une réponse bien définie sont identifiés et leurs séquences sont

connues, leur niveau d'expression peut être évalué. Cette approche doit anticiper les variations dans les niveaux de transcriptions afin d'être efficace, et a été développée principalement sur les espèces qui présentent un intérêt économique et / ou ont été soumises à de nombreuses études biochimiques et génétiques antérieures. La PCR quantitative ou PCR en temps réel est une méthode de mesure quantitative des procédés de transcription qui a été utilisée dans le cadre de cette étude pour évaluer le niveau d'expression d'une sélection des gènes chez des larves *M. galloprovincialis* exposées à différentes conditions de stress thermique et chimique. Il faut bien savoir que le génome entier de la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis* a été très récemment séquencé par [Murgarella et al. \(2016\)](#)

1.9.2 Biochimique :

1.9.2.1 Défense contre les métaux : Les Métallothionéines (Mts) :

Les Mts sont des protéines cytosoliques non enzymatiques de faible poids moléculaire (12-15 kDa), riche en cystéine, stable à la chaleur et inductible. Les groupes thiol (-SH) des résidus cystéine sont responsables de leur forte affinité pour les métaux lourds ([Margoshes & Vallee, 1957](#)). Les Mts ont été caractérisées dans de nombreux invertébrés aquatiques ([Amiard et al., 2006](#)) y compris les mollusques ([Amiard-Triquet et al., 1998](#); [Bebianno & Langston, 1998](#); [Ng et al., 2007](#)) et leurs larves ([Damiens et al., 2004](#)). Les Mts sont impliquées dans l'homéostasie des métaux lourds essentiels tels que le cuivre (Cu) et le zinc (Zn), la détoxification des cations métalliques toxiques tels que le cadmium (Cd) et le mercure (Hg) ([Amiard et al., 2006](#)), la protection contre le stress oxydatif ([Viarengo et al., 1999](#); [Bebianno et al., 2005](#)) et éventuellement dans la régulation de la transcription génique ([Roesijadi et al., 1998](#)). Deux grandes familles, MT10 et MT20, ont été décrites chez les moules ([Frazier, 1986](#); [Mackay et al., 1993](#); [Barysytte et al., 1999](#)). La concentration en Mts chez les moules est utilisée comme un biomarqueur d'exposition aux métaux lourds ([Baudrimont et al., 1997](#); [Bebianno & Machado, 1997](#); [Viarengo et al., 1997](#); [Baudrimont et al., 2006](#)).

La synthèse des Mts est principalement induite par les métaux essentiels (ou non) tels que Cu, Zn, Cd, Hg et Ag, mais aussi dans un moindre degré par des composés organiques tels que certains pesticides ou des antibiotiques. La grande variabilité de l'induction et les divers facteurs abiotiques ou biotiques influençant la synthèse des Mts conduisent à des résultats contradictoires dans la littérature, qui ont été discutés dans une revue concernant le rôle des Mts chez les invertébrés et leur utilisation comme biomarqueur ([Amiard et al., 2006](#)).

1.9.2.2 Défenses antioxydantes :

Le stress oxydatif est la conséquence d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives, le plus souvent dérivées de l'oxygène ou de l'azote, fortement oxydantes et leur destruction par des enzymes et autres molécules de défense antioxydante.

Au cours de l'évolution, les organismes aérobies ont développé des mécanismes de défense antioxydants dont la principale fonction est de bloquer et de désactiver les EROs. L'ampleur des dommages oxydatifs est directement liée à l'efficacité des systèmes antioxydants (Figure 1.9.1) qui se produisent dans les différentes espèces. Les systèmes sont composés d'une série d'enzymes cytosoliques, des molécules de faible poids moléculaire (glutathion, ascorbate, etc. . .) et plusieurs vitamines liposolubles (α -tocophérol, β -carotène). Parmi les systèmes antioxydants enzymatiques, la superoxyde dismutase (SOD) correspondent à une famille métallo-enzyme (contenant Cu, Zn, Fe, ou Mn), connue pour convertir l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2); la catalase (CAT) est une hémoprotéine qui est produite dans les peroxysomes et agit en décomposant le H_2O_2 en H_2O et O_2 , et la glutathion peroxydase (GPX) est une sélénoprotéine qui oxyde le glutathion. Elle assure la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment, de type ROOH en ROH.

La mesure des enzymes antioxydantes pourrait donner une indication du statut antioxydant de l'organisme et peut être utilisé comme un biomarqueur du stress oxydatif. De façon plus générale, l'évaluation des composantes des systèmes de défense anti-oxydants constitue un marqueur biologique non spécifique des effets néfastes des xénobiotiques (Valavanidis et al., 2006). Dans des conditions de stress, l'activité des enzymes de défense antioxydant peut être induite ou inhibée. Habituellement, l'induction est interprétée comme une adaptation des organismes, alors que l'inhibition reflète l'effet toxique des polluants et indique les dommages cellulaires (Cossu et al., 2000; Vasseur & Cossu-Leguille, 2003). Attig et al. (2014a) ont mis en évidence l'apparition d'un stress oxydatif dans la glande digestive des moules exposées au Ni ainsi qu'un gradient croissant de température.

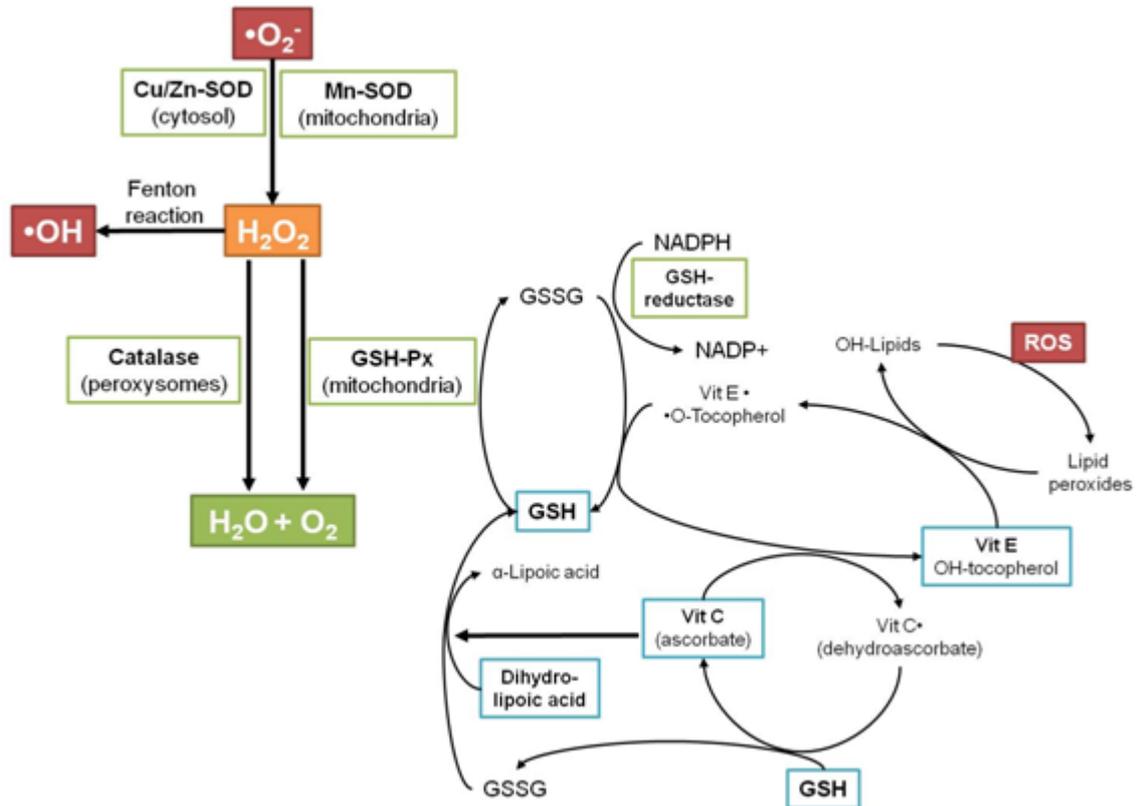


FIGURE 1.9.1 – Les systèmes de défense anti-oxydante dans l'organisme. (Fernández-mejía, 2013).

1.9.2.3 Protéines de stress :

Les protéines de choc thermique (HSP) ou protéines de stress sont une famille de protéines remarquablement conservées au cours de l'évolution et la plupart d'entre elles sont présentes dans les organismes procaryotes et eucaryotes (Jones, 1984; Morimoto, 1998). Les HSP sont habituellement classées selon leur poids moléculaire apparent sur gel d'électrophorèse (en kilo Dalton (kDa)), leurs principaux agents inducteurs et leurs fonctions (Jolly, 2000). La réponse cellulaire au stress a été signalée pour la première fois par Ritossa (1962), qui a observé l'induction des HSP suite à une élévation de température très importante, d'où leur nom. Les HSP sont maintenant appelées des protéines de stress car il a été démontré que d'autres stress peuvent aussi les induire y compris l'anoxie (Spector et al., 1986), la salinité (Ramagopal, 1987), les métaux (Rajeshkumar & Munuswamy, 2011; Kim et al., 2014), les xénobiotiques (Guisasola, 2008), et le stress oxydatif en général (Freeman et al., 1999). Plusieurs études ont confirmés l'implication de ces facteurs de stress dans l'induction des HSPs chez les moules *Mytilus galloprovincialis* (Mahmood et al., 2014; Ratkaj et al., 2015; Faggio et al., 2016).

1.9.2.4 Enzymes de phase II de biotransformation : la Glutathion-S-Transférases (GST)

La GST est une enzyme de biotransformation de phase II qui catalyse, au niveau de cytosol, la réaction de conjugaison des xénobiotiques à caractère lipophile et de leurs métabolites avec un ligand endogène polaire qui est le glutathion (GSH) (Habig et al., 1974). En effet, l'addition se fait soit directement sur les groupements fonctionnels du xénobiotique et dans ce cas, la molécule est directement métabolisée par la GST, soit, lorsque la molécule ne possède pas de groupement fonctionnel qui permet cette réaction, sur les groupements hydrophiles générés au cours de la phase-I par l'action préalable des mono-oxygénases à cytochrome P450. Les GSTs jouent donc un rôle majeur dans la neutralisation et la détoxication de certains xénobiotiques en augmentant leur hydrosolubilité et en facilitant ainsi leur élimination (Van der Oost et al., 2003). Cette particularité en a fait une activité intéressante en tant que marqueur biochimique d'exposition. L'expression de la GST a été montrée chez des larves d'huîtres exposées au malathion et au carbofuran (Damiens et al., 2004). Mais encore chez des moules exposées dans leurs milieu à des hydrocarbures, métaux... (Rocher et al., 2006).

Ces enzymes jouent également un rôle dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif (Rao & Shaha, 2000; Röth et al., 2011). A côté des GSTs cytosoliques qui sont impliquées dans la détoxication des composés électrophiles, il a été mis en évidence l'existence d'une forme membranaire de GST. Cette isoenzyme qui est activée par les espèces réactives de l'oxygène que sont les peroxydes

d'hydrogène et l'anion superoxyde, participe à la protection cellulaire vis-à-vis des altérations induites par des molécules oxydantes (Aniya & Anders, 1989). La GST microsomale participe également à la détoxification des produits réactifs issus de la lipoperoxydation (Berhane et al., 1994).

1.9.2.5 Acétylcholinestérase (AChE)

De nombreuses études ont démontré l'intérêt de l'évaluation de l' (AChE) chez les invertébrés marins comme marqueur biochimique d'exposition aux substances neurotoxiques (Brown et al., 2004; Cossi et al., 2015). En tant qu'indicateur d'effets neurotoxiques, l'AChE a souvent été testée dans le milieu marin comme un biomarqueur spécifique d'exposition aux organophosphorés et aux carbamates chez différentes espèces de vertébrés et d'invertébrés. Plus récemment, il a été montré que d'autres groupes de substances chimiques présentes dans l'environnement marin, y compris des métaux, sont susceptibles d'affecter l'activité AChE. En outre, l'activité AChE chez les bivalves est modifiée par des facteurs abiotiques tels que la salinité et la température (Pfeifer et al., 2005). Najimi et al. (1997) ont mis en évidence la sensibilité de l'AChE à la température avec une activité optimale entre 37 et 42 °C chez *Mytilus galloprovincialis* et 28 et 40 °C chez *Perna perna*. Attig et al. (2014a), ont montré une augmentation significative de l'activité de l'AChE dans les moules exposées au Ni et à l'augmentation de température (18 - 24 °C). Cependant, une inhibition significative de l'enzyme a été noté dans les moules exposées au Ni à la température la plus élevée (26 °C). Néanmoins, il peut s'avérer être un biomarqueur utile de stress physiologique général dans les organismes aquatiques.

1.9.3 Dommages de l'ADN :

La présence de polluants génotoxiques dans le milieu aquatique est une préoccupation croissante (Jha, 2004; Wurgler & Kramers, 1992). La détection et la quantification des altérations de l'ADN sont souvent utilisées en tant que biomarqueur de génotoxicité dans des conditions d'expositions aiguës ou chroniques. Habituellement, les conditions de stress induisent des perturbations cellulaires dans les organismes et une augmentation des dommages à l'ADN (Gravato et al., 2006; Banakou & Dailianis, 2010). Les cassures simple ou double brin de l'ADN peuvent résulter de l'effet direct ou indirect de l'agent génotoxique. La plupart des études publiées ces dernières années sont axées sur les dommages de l'ADN induits par le stress oxydatif. La préservation de l'intégrité de la molécule d'ADN est essentielle pour tous les organismes vivants, et ils mettent en place des systèmes de protection efficaces pour leur matériel génétique. Lorsque les perturbations de l'ADN deviennent permanentes, ils peuvent induire une altération des fonctions cellulaires

et la prolifération incontrôlée menant à la carcinogenèse. Enfin, lorsque ces dommages ne sont pas ou mal réparés et que l'ADN est répliqué, il peut produire une mutation qui est transmise aux générations futures (Burcham, 1999; Valavanidis et al., 2006; ?; Monserrat et al., 2007).

Le test Comet est une technique quantitative, rapide et visuelle, pour mesurer les cassures des brins d'ADN dans les cellules eucaryotes (Devaux et al., 1997). La méthode est basée sur la migration électrophorétique de l'ADN endommagé à partir du noyau, formant une comète, dont la tête correspond au noyau de la cellule avec l'ADN intact, tandis que la queue est formée par les brins d'ADN cassé. En 1984, Ostling et Johnson ont démontré la migration d'ADN des noyaux qui ont été exposés à un champ électrique dans des conditions neutres (Ostling & Johanson, 1984). Plus tard, en 1988, Singh et ses collègues ont modifié et optimisé cette procédure en utilisant des conditions alcalines qui ont considérablement augmenté sa spécificité et sa reproductibilité (Singh et al., 1988). Le test des comètes est souvent utilisé pour évaluer la génotoxicité des polluants chez les mollusques bivalves (Gielazyn et al., 2003; Akcha et al., 2012; Mai et al., 2012; Praveen Kumar et al., 2014; Behrens et al., 2016).

1.9.4 Comportement :

Parce que le comportement, une modification phénotypique, est contrôlé par la constitution génétique de l'individu et par son environnement, et parce qu'il relie la fonction physiologique aux processus écologiques, il est utilisé comme un indicateur intégrant la toxicité au niveau de l'organisme entier.

La réduction de la performance globale de l'organisme peut fournir des informations utiles sur les effets indésirables induits par un contaminant et permettre de déterminer un seuil de toxicité. Des impacts significatifs (ex : modification du comportement, la croissance et la reproduction, etc.) peuvent se produire en dessous de la concentration efficace médiane (CE50) (Dodson & Hanazato, 1995). Pour protéger l'écosystème aquatique, une évaluation rapide de l'activité toxique des polluants de l'environnement est nécessaire. Les changements de comportement peuvent être des indicateurs sensibles de la toxicité aigüe/sub-létale (Coelho et al., 2011) et sont particulièrement adaptés pour détecter le stress induit par des concentrations en polluants réalistes.

Les Effets des contaminants sur le comportement des bivalves adultes (Shin et al., 2002; Cooper & Bidwell, 2006; Bonnard et al., 2009; Buffet et al., 2011), et sur les larves des différentes espèces de poissons (Floyd et al., 2008; Kusch et al., 2008; Le Bihanic et al., 2014) ont été largement étudiés. Cependant, les études de comportement larvaire des mollusques bivalves ne sont presque pas étudiées. Très récemment, Gamain (2016) a évalué l'effet de cuivre et du métalochlore sur le comportement larvaire de l'huitre creuse.

Chapitre 2

Problématique et objectifs

Problématique de la thèse :

Notre planète connaît aujourd'hui des changements globaux qui affectent la biodiversité des écosystèmes, en particulier marins, dont les effets peuvent aller jusqu'à la perturbation de l'équilibre et à l'extinction de certaines espèces. Cependant, l'intensification des activités anthropiques sur les zones côtières et l'accélération du réchauffement climatique induisent chez les organismes aquatiques des situations de multi stress qui peuvent impacter leur potentiel adaptatif.

Les moules du genre *Mytilus* revêtent une importance écologique et économique, et elles sont utilisées comme des organismes sentinelles de la pollution des milieux marins côtiers. Or, les stades de développement précoces représentent le maillon le plus vulnérable dans leur cycle de vie. Ce groupe contient deux espèces qui semblent occuper une aire bio-géographique différentes en fonction de la température : la moule méditerranéenne d'eau chaude *M. galloprovincialis* et la moule bleue des eaux froides à tempérées *M. edulis*. En plus de l'importance écologique des moules dans les communautés intertidales et subtidales, *M. edulis* et *M. galloprovincialis* sont cultivées le long de la plupart des côtes européennes. L'hybridation entre les espèces de la moule *Mytilus spp* se produit facilement dans les endroits où leur distribution se chevauche.

L'effet des conditions environnementales sur les performances larvaires est également crucial pour comprendre la dynamique des espèces de moules pures et hybrides. La tolérance des larves provenant de croisements hybrides versus les espèces pures face à la température et à la pollution métallique a été étudié. Ceci nous a permis d'évaluer les pressions sélectives potentielles qui pourraient favoriser ou décourager l'hybridation.

Bien que la longue histoire des études physiologiques et écologiques des moules *Mytilus spp* adultes fournisse un aperçu considérable sur leurs réponses futures aux changements climatiques, l'interaction de multiples facteurs de stress, la vulnérabilité

bilité à l'évolution des conditions environnementales et les effets subséquents des changements démographiques chez *Mytilus spp* restent encore mal connus. *Quel est leur devenir dans un environnement qui ne cesse pas de devenir de plus en plus stressant ?*

Dans ce contexte, ce travail doctoral est axé sur l'approfondissement des connaissances sur les mécanismes de l'adaptation des premiers stades de vie de moule à l'impact combiné de deux facteurs environnementaux majeurs : la pollution métallique et l'accroissement des températures de surface. Pour cela on a envisagé d'étudier les effets de polluants métalliques (Cu et Ag) et d'un stress thermique seul ou en combinaison, chez les stades précoces de développement de deux espèces : *Mytilus galloprovincialis* et *Mytilus edulis* ainsi que leurs hybrides.

Objectifs de la thèse :

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

- Évaluation des effets délétères de l'augmentation de la température et de la pollution métallique sur le développement embryon-larvaire de la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis*. Pour ce faire, le test embryon-larvaire de toxicité de *M. galloprovincialis* a été utilisé pour évaluer l'effet d'une augmentation modérée de la température de l'eau sur le développement embryonnaire, pour déterminer l'embryotoxicité des métaux (seuls et en mélange) et de l'exposition combinée aux métaux et à l'augmentation de la température.
- Caractérisation des réponses adaptatives et/ou toxiques au niveau chimique, biochimique, génétique et transcriptomique chez les stades embryon-larvaires de la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis* exposés à des concentrations subléthales de cuivre et/ou d'argent et à un gradient croissant de températures. Pour ce faire, plusieurs marqueurs biochimiques ont été évalués : les activités catalase, superoxyde dismutase, glutathion-S-transférase et l'acétylcholinestérase ; le taux d'accumulation des métallothionéines et de l'acide thiobarbiturique. Les biomarqueurs d'altération et de réparation de l'ADN ont été analysés en utilisant le test des comètes classique et modifié. Dix-huit gènes cibles impliqués dans les défenses antioxydantes, la réparation de l'ADN, l'apoptose, la protéolyse, la transcription, le stress thermique et la détoxification métallique ont été étudiés chez les larves-D de moule *M. galloprovincialis*.
- Développement et optimisation d'un logiciel pour l'analyse et la caractérisation du comportement natatoire des larves D de moule en utilisant des enregistrements vidéo.
- Étude en laboratoire de capacités d'hybridation entre les deux espèces de moule étudiées *M. galloprovincialis* et *M. edulis*. Comparaison de la sensibilité des larves des espèces pures de moules, *Mytilus edulis* et *M. gallopro-*

vincialis, ainsi que leurs hybrides face à l'augmentation de température et à l'exposition au Cu et à l'Ag en utilisant le test embryo-larvaire de toxicité.

Chapitre 3

Bases méthodologiques

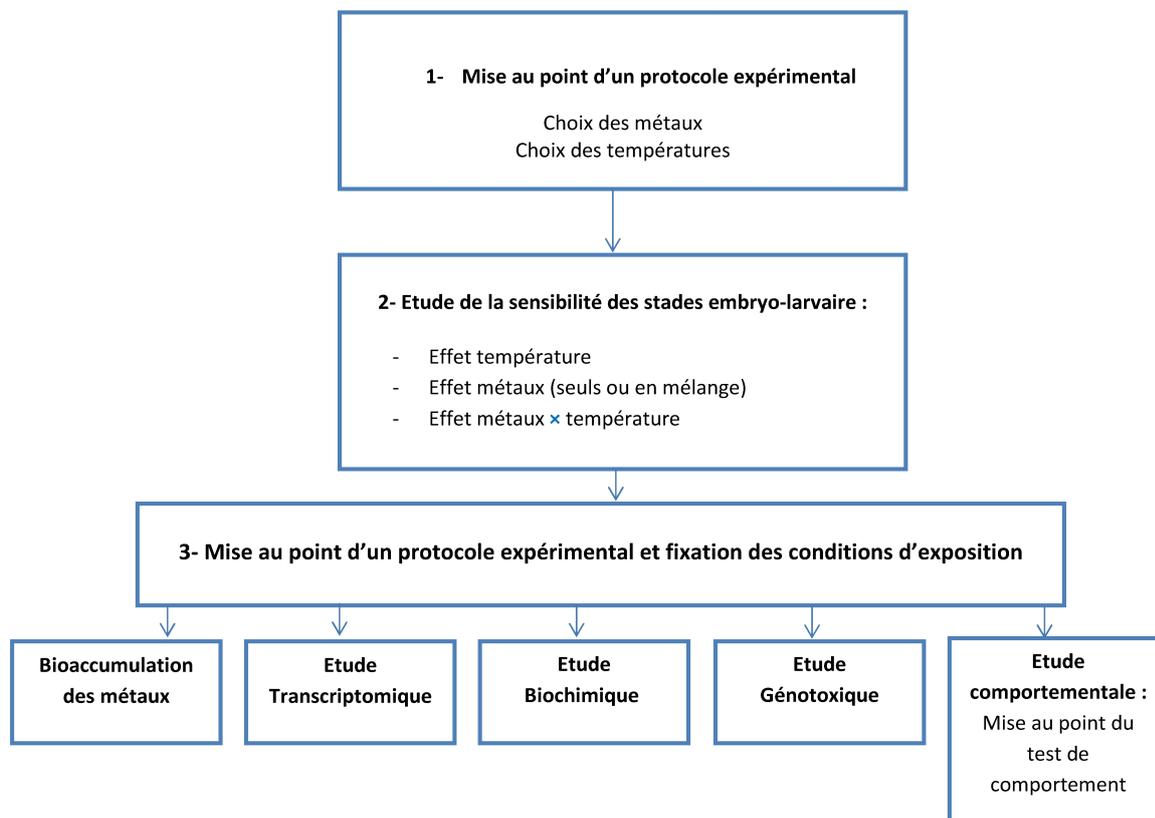
3.1 Démarche scientifique du projet de thèse

Ce travail doctoral présente deux enjeux principaux : le premier étant de proposer des réponses adaptatives et/ou toxiques chez les premiers stades de développement de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* exposée à des conditions environnementales de deux polluants modèles (cuivre et/ou argent) et à un stress thermique modéré. Pour ce faire, le test embryo-larvaire moule a été utilisé et le pourcentage de malformations a été observé 48 h après la fécondation. Par ailleurs pour mieux évaluer les effets induits et comprendre les réponses adaptatives des larves, les effets produits ont été analysés à différents niveaux d'organisation biologiques : Transcriptomique, Biochimique, Génotoxique et Comportemental. Les concentrations de métaux dans les solutions de travail des différentes manipulations et dans les larves ont été évaluées. Le deuxième objectif a été de comparer la sensibilité des stades embryo-larvaires de la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis*, la moule commune *M. edulis* et l'hybrides des deux aux métaux et stress thermique.

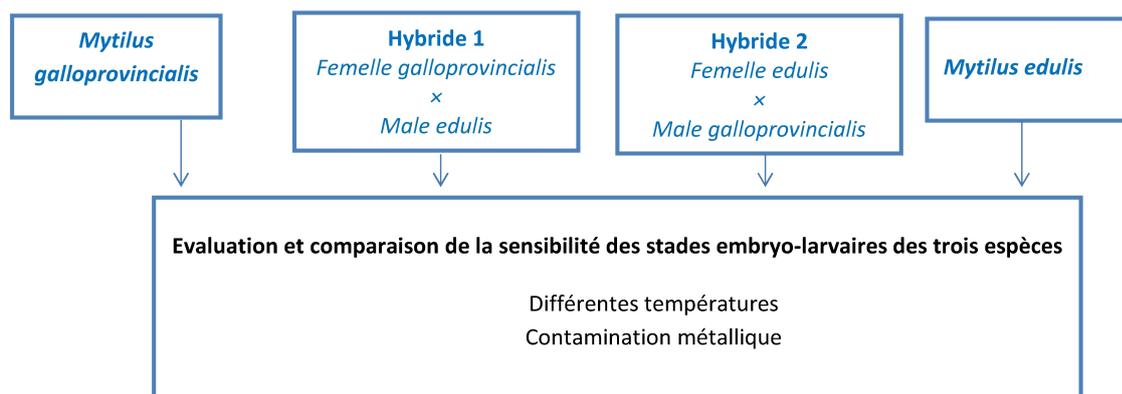
Puisqu'il n'y a pas des écloséries qui fournissent des moules matures et capables de pondre toute l'année, les manipulations durant cette thèse se sont déroulées de mi-février jusqu'à fin avril de chaque année. Cette période correspond à la période de synchronisation de maturité et de reproduction naturelle des deux espèces de moule utilisées : *Mytilus galloprovincialis* et *Mytilis edulis*.

1. Développement des bio-essais

Test embryo larvaire *Mytilus galloprovincialis*



2. Etude comparée



3.2 *Mytilus galloprovincialis*

Les moules méditerranéennes *M. galloprovincialis* utilisées dans cette thèse sont achetées le jour de la manipulation auprès d'un fournisseur (sur le marché) en provenance d'Espagne. Comme la principale période de reproduction des moules méditerranéennes est au printemps (une deuxième beaucoup moins importante au début de l'été) (Caceres-Martinez et al., 1993; Villalba, 1995; Bhabu, 2015), les manipulations ont eu lieu de mi-février jusqu'à fin avril. Les moules du genre *Mytilus* ne présentent aucun caractère morphologique de dimorphisme sexuel (Seed, 1969), la distinction du sexe ne se fait donc qu'après la libération des gamètes dans l'eau.

3.2.1 Test embryo-larvaire de toxicité

Le test embryo-larvaire moule est un test d'écotoxicité aquatique aigüe, il est bien décrit par His et al. (1999a) et Quiniou et al. (2005) et il est normalisé depuis 2009 (AFNOR, 2009)

3.2.1.1 Eau de mer de référence

L'eau de mer a été collectée au "Banc d'Arguin" (Bassin d'Arcachon, SW de la France) (Figure 3.2.1), qui est une réserve naturelle à la sortie des passes du Bassin d'Arcachon mais ouvert sur l'océan (salinité ~33 u.s.i). Immédiatement après le prélèvement, l'eau de mer a été filtrée à l'aide d'une pompe de filtration équipée de 3 membranes de filtration 5, 1 et 0,2 μm et d'un système UV. Cette étape permet d'éliminer les débris et microorganismes potentiellement présents dans l'eau et limite les effets proliférations bactériennes pouvant perturber le bon développement larvaire.

L'eau de mer filtrée (FSW) a été stockée à 4 °C à l'obscurité jusqu'à utilisation. Selon la norme AFNOR (2009), il est recommandé de l'utiliser dans les deux semaines qui suivent, mais dans notre cas dans la plupart de temps a été utilisé dans les 3 jours qui suivent.

Préalablement à chaque expérience, les paramètres physico-chimiques de l'eau (le niveau d'oxygène dissous, la salinité et le pH) ont été vérifiés. La teneur en oxygène dissous a été mesurée en utilisant une électrode à oxygène couplée à un boîtier Pressens Fibox3 et en utilisant un logiciel PST3v 602. La Salinité a été mesurée à l'aide d'un conductimètre WTW. Le pH a été mesuré à l'aide d'une électrode époxy couplée à un pH mètre (pH 537) et étalonné avec des solutions tampons de pH standards (Hanna Instruments, Roumanie).

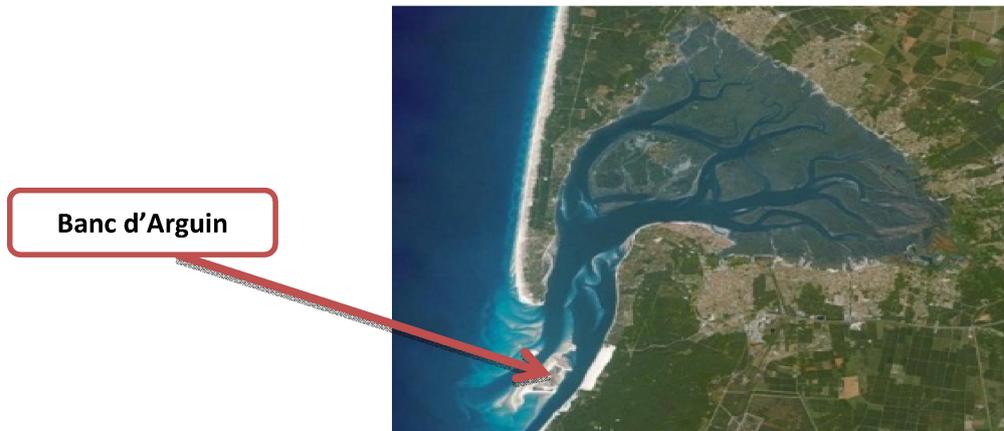


FIGURE 3.2.1 – : Carte de bassin d’Arcachon représentant le site de prélèvement de l’eau de mer de référence : le Banc d’Arguin.

3.2.1.2 Préparation des solutions de contamination

Le sulfate de cuivre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, CAS 7758-99-8, 99,999 %) et le nitrate d’argent ($AgNO_3$, CAS 7761-88-8, 99,999 %) ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich (St.Quentin Fallavier, France). Les solutions mère de cuivre (250 mg/L) et d’argent (100 mg/L), utilisées pour la préparation des solutions de contamination, ont été préparées dans de l’eau Milli-Q et conservées à 4 °C.

Dans le but d’évaluer l’effet dose réponse des métaux seuls ou en mélange couplés à l’effet de la température, des solutions de contamination ont été préparées dans l’eau de mer filtrée préalablement.

Deux séries d’expériences indépendantes ont été réalisées pour évaluer l’effet toxique des métaux seuls puis en mélange.

Pour l’évaluation de l’effet toxique des métaux simples, les solutions mères ont été utilisées pour préparer des aliquotes de cuivre (0,5, 5, 15, 50 et 500 $\mu\text{g/L}$) et d’argent (0,1, 1, 3, 10, 30 et 100 $\mu\text{g/L}$) par dilution dans de l’eau de mer filtrée. Des concentrations environnementales ont été choisies pour déterminer l’impact réel du contaminant et d’autres concentrations dix et cent fois supérieures afin de discriminer au mieux l’effet des polluants et déterminer l’effet dose réponse et les différentes concentrations efficaces des deux métaux appliqués.

Dans une deuxième série d’expériences, des mélanges binaires ont été préparés en mélangeant les deux composés à leurs concentrations efficaces CE5 Cu + CE5 Ag ; CE10 Cu + CE10 Ag ; CE25 Cu + CE25 Ag et CE50 Cu + CE50 Ag dans le but de discriminer au mieux les effets de ces deux métaux sur les stades embryolairvaires.

3.2.1.3 Choc thermique et obtention des gamètes

L'induction de la ponte est réalisée par un processus de stimulation thermique des géniteurs adultes placés dans l'eau de mer de référence filtrée. Les moules sont placées alternativement pendant 30 minutes dans un bain d'eau froide (15 °C) puis dans un bain d'eau chaude (20 °C) (Figure 3.2.2-A).

Pour les moules femelles, les ovules sont émises sous la forme de rubans de couleur orangée (Figure 3.2.2-C) alors que le sperme des mâles est émis sous forme d'un jet de couleur blanche (Figure 3.2.2-D). Dès le début de l'émission de leurs gamètes, chacun des mâles et des femelles est isolé dans un petit volume d'eau de mer filtrée (250 ml) à la température du bain ayant fait pondre l'animal.

Avant de procéder à la fécondation, il s'agit de sélectionner, par vérification sous microscope, les moules ayant des gamètes en bon état : les ovocytes les plus réguliers, et ayant une forme ronde et les spermatozoïdes les plus mobiles et dense (Figure 3.2.2-E,F). Ensuite, la solution contenant les ovocytes est filtrée à l'aide d'un tamis à 100 μm et la solution de sperme sur tamis à 50 μm , cela permet d'éliminer les débris.

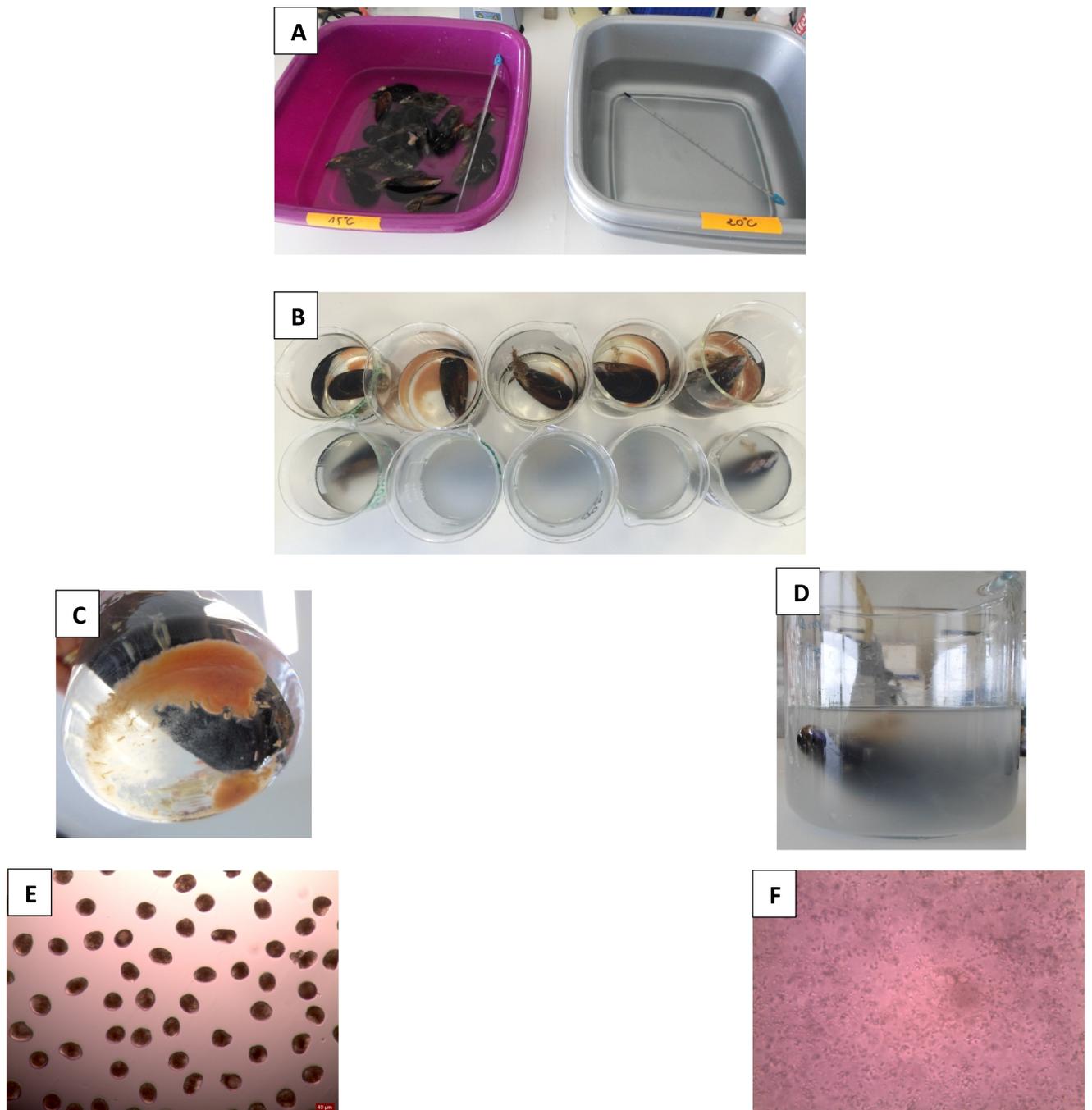


FIGURE 3.2.2 – (A) Bains de choc thermique, (B) isolement des moules qui commencent à frayer, (C) une moule femelle et (D) une moule mâle en cour d'émission de gamètes, (E) : vérification microscopique des ovules et (F) des spermatozoïdes.

3.2.1.4 Fécondation

La fécondation a lieu par ajout de quelques millilitres de la solution de sperme dans la solution contenant les ovocytes. Pour que la fécondation puisse avoir lieu, il faut environ dix spermatozoïdes autour de chaque ovocyte. On peut le vérifier sous microscope. À l'aide d'un agitateur manuel, on homogénéise le mélange pour éviter la polyspermie et favoriser la rencontre des gamètes. L'apparition d'un globule polaire signifie le succès de la fécondation (Figure 3.2.3). Environ 60 minutes après la fécondation, les œufs qui commencent la première division sont répartis dans des micro-plaques de 24 puits (Cellstar, Greiner Bio-one) contenant les différents milieux à tester à raison de 2 ml par puits et quatre réplicats par condition étudiée. Le nombre maximal d'embryons par puits est 250 à 300, pour cela il faut prélever 5 μ l de la solution de fécondation et dénombrer sous microscope photonique les ovocytes pour pouvoir déterminer le volume nécessaire contenant 250-300 embryons à mettre dans chaque micro-puits. Chaque condition est réalisée minimum avec trois couples de géniteurs.

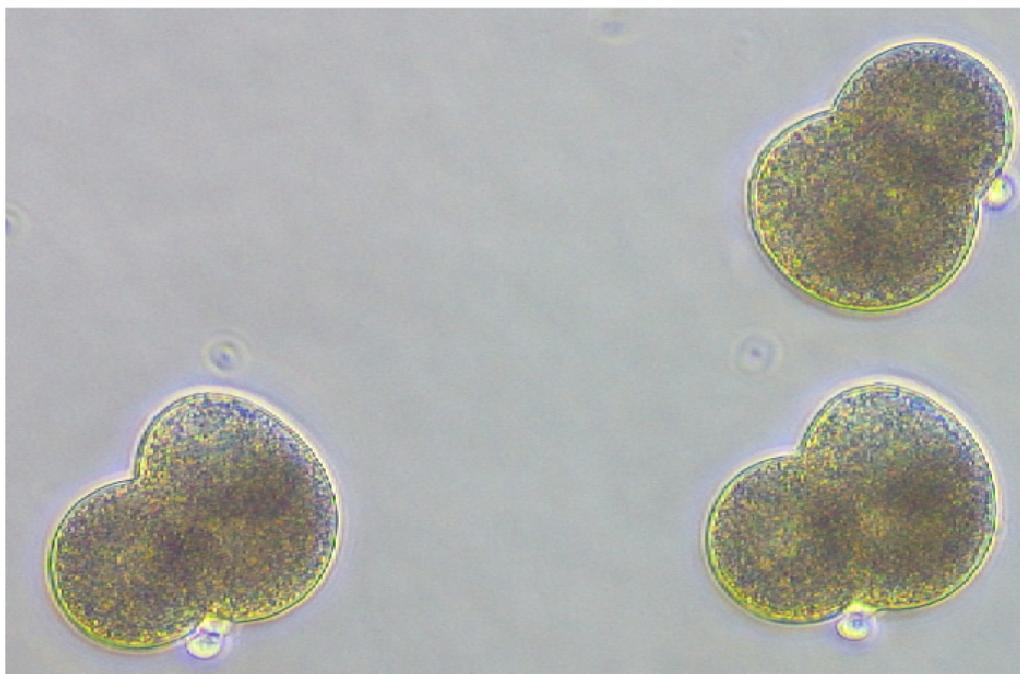


FIGURE 3.2.3 – Embryons de moule méditerranéenne au stade première division cellulaire ($\times 200$).

3.2.1.5 Incubation

Les micro-plaques contenant les embryons dans les différentes solutions contaminantes sont ensuite placées dans des enceintes thermo-réglées (Schnitzer Scientific) à l'obscurité pendant 48 h jusqu'à atteindre le stade larve-D. Pour l'étude de l'effet de la température, 4 enceintes ont été utilisées : une à 18 °C : température idéale de développement des larves des moules (His et al., 1997) et les 3 autres à 20, 22 et 24 °C. Ce choix de la gamme de températures est basé sur les différents scénarios du GIEC : une augmentation de la température moyenne globale de la surface à la fin du 21^{ème} siècle (2081-2100) par rapport à 1986-2005 est probable d'être de 0,3 °C à 1,7 °C selon le scénario RCP2,6, 1,1 °C à 2,6 °C selon le scénario RCP4.5, 1,4 °C à 3,1 °C selon le scénario RCP6,0 et 2,6 °C à 4,8 °C selon RCP8,59. Selon les scénarios les plus pessimistes, une augmentation de 5,8 °C est prévue d'ici 2100 (IPCC, 2014). Après 48 h d'incubation, 25 µl de formol à 37 % sont ajoutés par micro-puits pour stopper le développement. L'analyse peut être faite instantanément ou ultérieurement sous condition que les micro-plaques soient conservées à 4 °C.

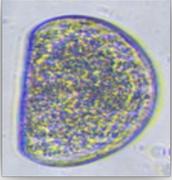
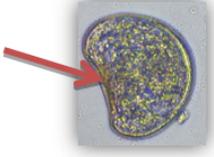
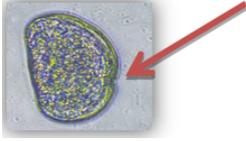
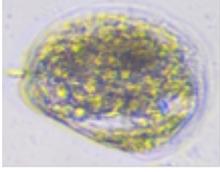
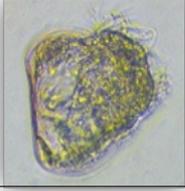
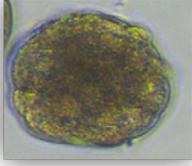
3.2.1.6 Analyse du développement larvaire

Le pourcentage de larves-D malformées a été déterminé par l'observation et le dénombrement de 100 larves sous un microscope inversé à un grossissement 400X équipé d'un appareil photo numérique et d'un logiciel d'acquisition d'images (Nikon, Inverted Microscope Eclips, TS 100/TS100-F, TS100LED MV/TS100 LED-F MV). Selon la norme AFNOR (2009), le test est validé et les résultats sont exploitables si les conditions suivantes sont satisfaites : (1) le pourcentage de larves-D normales est égal ou supérieure à 80 % pour les conditions témoins (incubés seulement dans l'eau de mer filtrée) (Quiniou et al., 2005) et (2) la EC50 du $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ exprimée en Cu^{2+} est comprise entre 6 et 16 µg/L.

Une larve est considérée bien formée seulement si elle prend la forme d'un D, toutes les autres formes de larves seront considérées comme anormales. Plusieurs types d'anomalies peuvent être rencontrés (Tableau 3.1) :

- Anomalie de la coquille : charnière concave ou convexe, bords déformés
- Anomalie du manteau : manteau retracé entre les valves de la coquille ou hypertrophié
- Anomalie de la segmentation : arrêt de développement et blocage au stade embryon

TABLE 3.1 – Malformations larvaires identifiées sur les larves D de *Mytilus galloprovincialis*

Descriptions		Observations
Larves-D normale		
Anomalies de coquille	Charnière concave	
	Échancrure	
Anomalies du manteau	Manteau rétracté	
	Hypertrophie avec expulsion	
Arrêt de développement		

A partir des résultats de l'effet dose-réponse des métaux, les conditions d'étude (concentration des métaux et la température) sont fixées et se sont les mêmes pour toutes approches, Chimique, Transcriptomique, Biochimique, Génotoxique et Comportemental, menées chez les stades embryo-larvaires de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis*.

Des embryons de moules *M. galloprovincialis* juste fécondés ont été exposés à une concentration de cuivre CE20 $\text{Cu} = 9.54 \mu\text{g/L}$; une concentration d'argent CE20 $\text{Ag} = 2.55 \mu\text{g/L}$ et une concentration de mélange composé de $\text{Cu} = 6.67 \mu\text{g/L}$ (CE10) et d' $\text{Ag} = 1.47 \mu\text{g/L}$ (CE10) à 18, 20 et 22 °C (Figure 3.2.4). Ces concentrations ont été choisies pour obtenir des effets quantifiables tout en limitant les effets aigus (arrêt de développement). Le but a été de mieux comprendre l'effet, au niveau moléculaire, d'une dose qui est acceptable au niveau phénotypique et de discriminer au mieux les mécanismes adaptatifs/toxiques chez les stades précoces de développement de la moule. L'étude des effets combinés des mélanges de contaminants est d'un intérêt croissant, parce que les organismes, dans des conditions environnementales réelles, sont rarement exposés à un seul polluant. Le choix de mélange des CE 10 des deux métaux a été comme pour les métaux simples, pour évaluer une dose qui cause 20 % de malformations. De plus, ces concentrations d'exposition sont relativement plus importantes que les concentrations environnementales dans le but d'obtenir des résultats quantifiables, à savoir les changements de concentration de métal dans les tissus après relativement un court temps d'exposition (quelques heures).

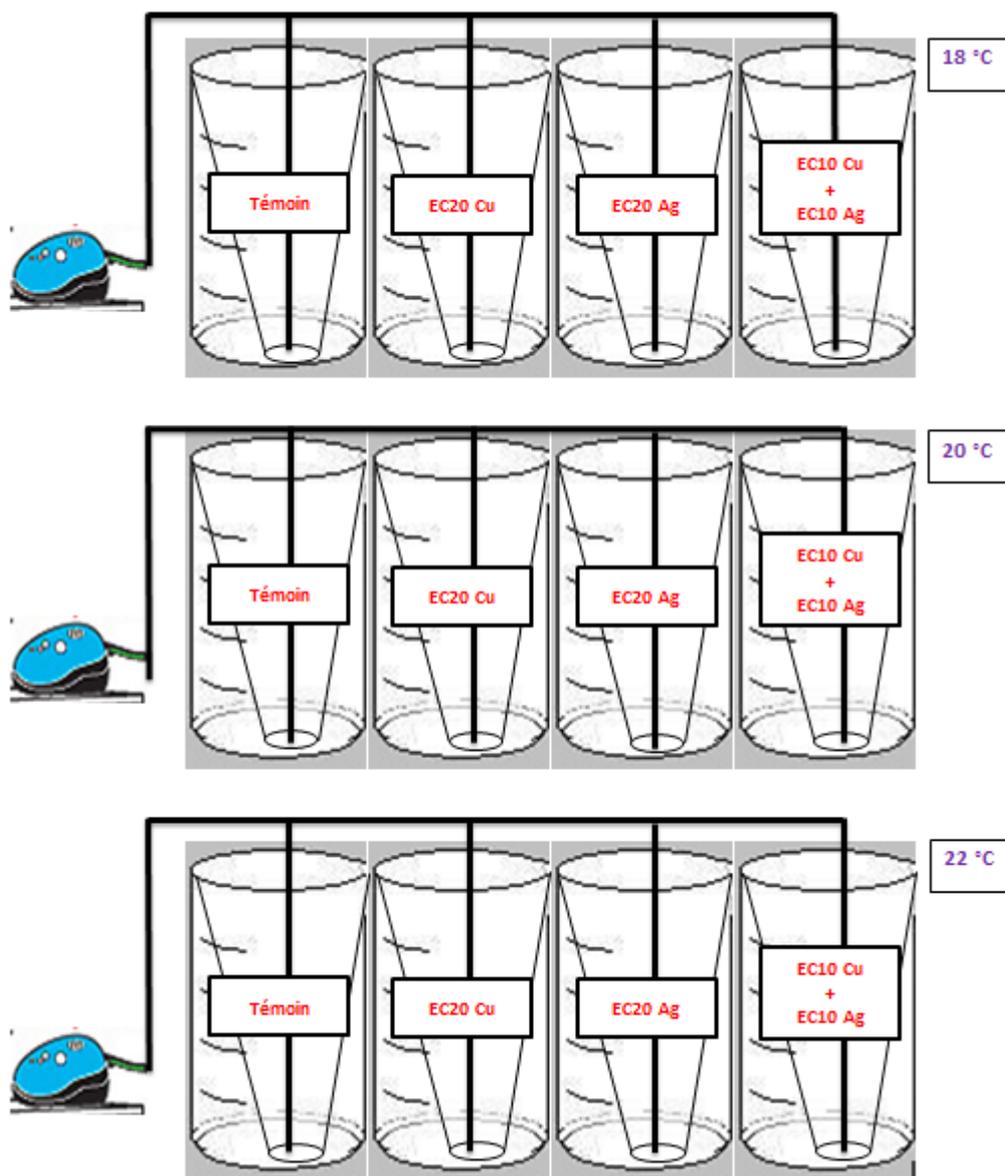


FIGURE 3.2.4 – Présentation schématique des conditions d'exposition des larves utilisées pour les approches Chimique, Transcriptomique, Biochimique, Génotoxique et Comportemental. 4 L d'eau de mer filtrée et 500 000 embryons justes fécondés d'un seul couple par bécher.

3.2.2 Dosage des métaux

Le dosage du cuivre et de l'argent a été effectué sur l'ensemble des solutions de contamination utilisées au cours de ces travaux de thèse et également dans la matrice biologique (pool de 600.000 larves-D environ par replicat) par mes soins et ceux de Pierre-Yves Gourves de l'équipe « Écotoxicologie Aquatique » (UMR CNRS 5805 EPOC). Ces dosages ont été effectués soit par la technique de Spectromètre d'émission atomique couplée au plasma inductif (ICP-OES 720 ; Agilent Technologies) soit par la technique de la spectrométrie d'absorption atomique (Varian SpectrAA 220 FS, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) selon les concentrations en jeu. Le détail de ces analyses est présenté dans les paragraphes suivants.

3.2.2.1 Conservation des échantillons

Les concentrations en cuivre et argent dans les solutions servant à la réalisation des différentes expositions des embryons de moules, ainsi que dans l'eau de mer filtrée qui a servi comme condition contrôle, ont été déterminées. Pour cela, 50 ml d'eau ont été conservées dans des tubes de polypropylène et directement acidifiés à 5% (v/v) avec de l'acide nitrique à 65% (Sigma Aldrich), et enfin conservés à 4 °C avant analyse. Pour l'analyse des niveaux de bio-accumulation, environ 600.000 larves ont été filtrés sur des tamis de 45 µm, puis récupérés dans des tubes Eppendorf et ensuite pesés avant d'être conservés à -80 °C en attendant leurs minéralisation.

3.2.2.2 Préparation des échantillons

a. Solutions de contaminations

L'analyse des métaux dans des solutions aqueuses ne nécessite aucune préparation préalable. Au moment de l'analyse, les solutions sont bien homogénéisées avant d'être placées pour analyse.

b. Les échantillons biologiques (Larves-D de moule)

48 h avant la minéralisation, les larves sont décongelées et séchées dans une étuve à température d'environ 50 °C pendant deux jours. Le poids des différents échantillons est déterminé. Les larves séchées (20 à 50 mg sec) ont été collectées dans des tubes en polypropylène puis digérées avec 1 ml de HNO_3 . Ensuite, ce mélange a été chauffé dans un bloc chauffant (hot block CAL 3300, Environmental Express, USA) pendant 3 heures à 100 °C. Après refroidissement, 5 ml d'eau ultra-pure (Milli-Q®) ont été ajoutés. En parallèle, 4 tubes contenant le matériel de référence international certifié le DOLT-5 (Dog fish Liver Certified Reference

Material for Trace Metals and other Constituents) ont été préparés dans les mêmes conditions afin de vérifier la validité de la méthode. La poudre sèche (entre 80 et 85 mg) et 3 ml de HNO_3 ont été chauffés par le bloc chauffant pendant 3 heures à 100 °C, et 15 ml d'eau Milli-Q, ont été ajoutés à la solution après refroidissement. Enfin, 4 blancs ont été préparés. Cette fois-ci, les tubes ont été remplis avec seulement 3 ml de HNO_3 avant le chauffage pendant 3 heures à 100 °C, et 15 ml d'eau Milli-Q ont été ajoutés après refroidissement.

3.2.2.3 Analyse des métaux

TABLE 3.2 – Limite de détection (LD) et limite de quantification (LQ) du cuivre et de l'argent pour le four et l'ICP-OES.

	Ag		Cu	
	Four	ICP-OES	Four	ICP-OES
LD ($\mu\text{g/L}$)	0,002	0,4	0,5	2,26
LQ ($\mu\text{g/L}$) (avec 5 % d'incertitude)	0,01	4	1,3	22,6

a. Dosage des métaux par Spectromètre d'émission optique couplée au plasma inductif : ICP-OES

Les concentrations de Cuivre et de l'Argent, dans les solutions aqueuses et les échantillons minéralisés, ont été déterminées par Spectromètre d'émission optique couplée au plasma inductif : ICP-OES (Agilent Technologies, 700 Series ICP-OES). La validité de la méthode est vérifiée par un échantillon certifié de référence DOLT-5 (foie de requin) qui a subi les mêmes étapes de traitement que les échantillons. Les valeurs obtenues doivent être dans la gamme certifiée (cuivre : 35.0 ± 2.4 mg/kg et argent : 2.05 ± 0.08 mg/kg). La limite de détection du cuivre et de l'argent a été de 0.4 $\mu\text{g/L}$ et de 2.26 $\mu\text{g/L}$ respectivement (Tableau 3.2).

Tout d'abord, l'échantillon liquide aspiré par une pompe péristaltique est transformé en aérosol dans la chambre à nébulisation par un nébuliseur (Sea-Spray ; Agilent) grâce à un courant d'argon gazeux sous haute pression. Cette première étape est appelée la nébulisation. Ensuite, les fines gouttelettes formées sont injectées dans une torche à plasma à très hautes températures (jusqu'à 8 000 °C), provoquant la dissociation des atomes et leur ionisation. Les ions excités de chaque élément retournent ensuite à leur état fondamental stable en émettant une énergie thermique ou radiative à des longueurs d'ondes spécifiques à chaque élément. L'intensité des radiations émises étant proportionnelle à la concentration de l'élément considéré, celles-ci sont captées et quantifiées par un système optique complexe.

Les différents paramètres pour l'ICP-OES lors de dosages sont présentés dans le tableau 3.3.

TABLE 3.3 – Les différents paramètres utilisées lors du dosage par Spectromètre d'émission optique couplée au plasma inductif : ICP-OES.

Conditions d'utilisations des raies	Puissance (kw)	1,2
	Débit plasmagène (L/mn)	15
	Débit auxiliaire (L/mn)	1,5
	Débit nébuliseur (L/mn)	0,75
	Temps de lecture par réplique (s)	6
	Délai stabilisation (s)	7
Paramètres introduction échantillons	Délai prélèvement (s)	1
	Vitesse pompe (t/min)	20
	Temps rinçage (s)	60
	Pompe rapide	Introduction/Rinçage
Paramètres généraux	répliques	3

b. Dosage des métaux par spectrométrie d'absorption atomique à four

Lorsque les concentrations attendues en Cu et/ou Ag dans l'eau (pas pour les échantillons biologiques dosés) étaient trop faibles pour être dosées en ICP-OES, la spectrométrie d'absorption atomique électrothermique à effet Zeeman (Varian SpectrAA 240 Z, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) a été utilisée. Cette technique est caractérisée par une limite de détection pour le cuivre et argent plus basse que celle de l'ICP-OES (Tableau 3.2). L'échantillon liquide à doser est déposé par le passeur dans un atomisateur contenant un four en graphite. Il subit plusieurs traitements thermiques sous flux d'argon qui protège le four en graphite de l'oxygène à très forte température. Lorsque l'échantillon est déposé dans le four, une série de températures croissantes et de durées variables va permettre successivement la dé-solvation (séchage), la pyrolyse (destruction d'un corps organique par la chaleur), la minéralisation (décomposition des molécules), l'atomisation (vapeur monoatomique) et le nettoyage du four. La pyrolyse et la minéralisation ont pour but d'éliminer le maximum de composés de la matrice responsables de l'absorption non spécifique. Cette étape est très importante lorsque des éléments sont

dosés à l'échelle du $\mu\text{g/L}$. Pour améliorer ces étapes, des modificateurs de matrice ou d'analyte sont ajoutés aux échantillons à doser. Ces derniers convertissent certains éléments de la matrice en de nouveaux éléments présentant des températures de décomposition/sublimation plus faibles permettant leur élimination lors des étapes de pyrolyse ou de minéralisation. La décomposition thermique de l'échantillon se déroule en 5 étapes avec des paliers de 85, 95, 120, 400 et 1400 °C pour se trouver sous forme atomisée. A la fin, le four procède une étape de nettoyage à 2300 °C durant 2,4 s avant de passer à l'analyse suivante. Une lampe à cathode creuse émet un rayonnement spécifique de l'élément étudié (328,1 nm pour l'Ag et 327,4 pour le Cu) qui traverse le four graphite dans lequel la solution est déposée. Pour surmonter la probabilité qu'une interférence vienne fausser les mesures, des modificateurs de matrices ont été utilisés pour éviter la mesure de toutes autres molécules contenues dans l'échantillon. Lors du dosage de l'argent le $(\text{NH}_4) \text{H}_2\text{PO}_3$ a été utilisé comme modificateur et le Palladium a été utilisé lors de dosage de cuivre.

3.2.3 Étude Transcriptomique

Le niveau de transcription de 18 gènes d'intérêt a été étudié chez des larves-D de 4 couples (4 réplicats biologiques), 40 000 larves ont été utilisées par réplicat. Après 48 h d'exposition, la formation des larves-D a été vérifiée sous microscope. Les larves ont été filtrées sur un tamis de 40 μm et ensuite récupérées avec un volume minimal d'eau de mer filtrée maintenue à la température d'exposition. Ensuite, les larves ont été centrifugées pour les récupérer en culot. Enfin, le surnageant contenant l'eau de mer a été éliminé et 500 μL de RNA Later (RNAlater, Sigma-Aldrich) ont été ajoutés avec remise en suspension des larves. Enfin, les échantillons ont été conservés à -20 °C jusqu'à l'analyse ultérieure.

3.2.3.1 Extraction des ARN totaux

Le protocole utilisé pour l'extraction des ARN totaux des pools de larves est celui de [Chomczynski & Sacchi \(1987\)](#) en utilisant l'acide phénol-chloroforme et le Trizole (Sigma-Aldrich). Les larves préalablement conservées dans une solution de stabilisation « RNA Later » à -20 °C ont été centrifugées pour les récupérer en culot puis broyées dans 1 ml de Trizole. Après, on ajoute 0,2 ml de chloroforme et une première centrifugation est réalisée (12 000 rpm ; 15 minutes ; 4°C). Ensuite, la phase supérieure (environ 500 μL) a été récupérée à laquelle 500 μL d'isopropanol ont été ajoutés et une deuxième centrifugation est réalisée (10 000 rpm ; 10 min ; 4 °C). On garde le culot qui est lavé avec 1 mL d'éthanol 75 % et une dernière centrifugation est faite (10000 rpm ; 10 min ; 4 °C). Enfin, le culot a été séché à l'air puis ré-suspendu dans 110 μL d'eau RNase-free (RNase-free water). 10 μL de cet extrait ont été utilisés pour vérifier la qualité et la pureté des échantillons d'ARN

par spectroscopie et sur gel d'agarose (tampon TBE 0,5 ×). Le volume qui reste est conservé à -20 °C dans 10 µl d'acétate de sodium et 220 µL d'éthanol.

3.2.3.2 Rétro-transcription des ARN

Cette étape permet la synthèse des ADNc à partir des ARN préalablement extraits.

La transcription inverse est réalisée sur 1,5 à 2 µg d'ARN total dilué dans 20 µL d'un mélange réactionnel composé des amorces « Random », dNTPs (0,5 mM), 200U de M-MuLV H-RT (enzyme Reverse Transcriptase) et le tampon 1X M-MuLV H-RT tel que décrit par [Dondero et al. \(2005\)](#).

1 µL d'hexamère aléatoire (Random hexamer (R6)) et 9 µL d'eau ultra-pure sont ajoutés à 1 µL d'ARN. Les échantillons sont placés dans un thermocycleur (GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems) pendant 5 minutes à 70°C (dénaturation de l'ARN par un choc thermique) dans le but de favoriser la fixation des amorces sur les ARN puis 5 min à 4 °C. Pour être sûr que cette étape de refroidissement est bien réalisée, les tubes eppendorf contenant les échantillons d'ARN sont placés sur la glace. Par la suite, 9 µL de mélange réactionnel sont ajoutés à chaque échantillon. Les tubes sont alors de nouveaux placés dans le thermocycleur et incubés à 25 °C pendant 10 min ; 42 °C pendant 60 min ; 55 °C pendant 20 min ; 70 °C pendant 10 min puis un refroidissement rapide à 4 °C. Durant cette phase, les amorces oligo-dT hybridées sur la queue poly(A) des ARNm d'intérêt lors de la première étape permettent, grâce à leur extrémité 3'-OH libres, d'initier la transcription inverse qui utilisera les désoxyribonucléotides dNTP (G, A, C et T) ajoutés au début de la RT pour synthétiser l'ADNc.

3.2.3.3 Conception des amorces

Dix-huit gènes cibles impliqués dans la défense antioxydante, la réparation de l'ADN, l'apoptose, la protéolyse, la transcription, le stress thermique et la détoxification métallique ont été étudiés chez les larves-D de moule *M. galloprovincialis*. Les numéros d'accès des 18 gènes utilisés sont documentés dans l'annexe III. Pour chaque gène deux amorces spécifiques sens (5'→3') et anti-sens (3'→5') ont été déterminées en utilisant le logiciel Beacon v3.0 (Premier Biosoft International, Inc.). Toutes les amorces et les sondes doublement marquées « Taqman » ont été synthétisées par MWG-BiotechGmbH (Allemagne).

3.2.3.4 PCR quantitative en temps réel :

Une PCR en temps réel se déroule comme suit :

- Une première phase de dénaturation se déroule pendant : 30 s à 95 °C pour dénaturer l'ADN et activer l'enzyme
- L'amplification se découpe en 40 cycles de trois phases chacune : (1) Une phase de dénaturation à 95 °C qui dure 30 s ; (2) Une phase d'hybridation des amorces sur la matrice d'ADNc réalisée à 64 °C et qui dure 20 s et (3) Une phase d'élongation à 72 °C d'une durée de 20 s
- Mesure de la spécificité de l'amplification « melting curve »

L'ADNc (25 ng d'ARN qui a subi une transcription inverse à l'ADNc) a été amplifié dans un système de PCR en temps réel CFX384 (en Bio-Rad) avec iQTM selon les instructions du fabricant pour le protocole triplex. Toutes les combinaisons de multiplexes représentaient les deux balises de fluorescences : 6-carboxy fluorescein / Black Hole (BH) 1, 6-carboxy-2,4,4,5,7,7-hexachlorofluorescein /BH1, et Texas Red/BH2. Brièvement, l'ADNc a été amplifié en présence de 1X IQTM mix Multiplex Power, 0,3 μ M de chaque amorce et 0,1 μ M chaque sonde dans un volume final de 10 μ L. Le niveau d'expression relative de tous les gènes étudiés a été évalué en utilisant les sondes Taqman selon [Negri et al. \(2013\)](#) sauf pour les gènes mt10 ; mt20 et la calreticuline où leur niveau d'expression a été évalué par la SYBER GREEN (EvaGreen@dye ; Bio-Rad Laboratories). Une analyse Taqman en triplex a été développée pour amplifier 25 ng d'ARN, qui a subi une transcription inverse à l'ADNc, en présence de 0,1 μ M des deux balises de fluorescences (hexachlorofluorescein/BH1 pour β -actin, Texas Red/BH2 pour 18S rRNA et Hex/BH2 pour riboL27) et 0,1 μ M, 0,4 μ M et 0,4 μ M des amorces sens et antisens, respectivement, pour l'ARNr 18S et la protéine actine, riboL27. Pour toutes les analyses Taqman, le protocole thermique était le suivant : 30 s à 95 °C, suivi de 40 cycles de 10 s à 95 °C et 20 s à 60 °C. La qRT-PCR a été réalisée avec quatre répétitions biologiques et trois répétitions techniques. Pour les analyses utilisant le SYBER GREEN, le protocole thermique a été présenté par [Dondero et al. \(2005\)](#).

Les analyses statistiques ont été effectuées sur les valeurs moyennes de groupe à l'aide d'un test de répartition aléatoire ([Pfaffl et al., 2002](#)).

3.2.4 Dosage des Métallothionéines (Mts) par SDS-PAGE

Au cours de ce travail de thèse, les teneurs en Mts ont été dosées sur un pool de 500.000 larves-D par réplicat en utilisant une analyse fluorométrique par SDS-PAGE selon le protocole décrit par [Viarengo et al. \(1997\)](#) et [Dondero et al. \(2005\)](#) et en utilisant le kit MT-PAGE CELL (Ikzus Environment, Italie). MT PAGE CELL est un système de réactifs constitué de 6 solutions stabilisées et prêtes à être utilisées pour une détermination quantitative des Mts. Les résidus cystéines sont alkylées et bloquées par l'utilisation de « réactif fluorogénique » qui est très spécifique et très sensible au groupement sulfhydryles des Mts. Ces adduits sont très

fluorescents, stables et seulement modérément photolabiles. Après SDS-PAGE, les Mts sont visualisées sur UV transillumination (UV Transilluminator) et identifiées par l'utilisation de MTs standards purifiées. Par la suite, la concentration protéique peut être évaluée par l'analyse de fluorescence de gel. MT PAGE CELL peut être associé à une précipitation des Mts à l'alcool pour les échantillons dilués ou en faible quantité (ce qui est le cas pour les larves de moules). Sa limite de sensibilité est aux alentours de 2.5 pico moles (0.02 µg) de protéines.

3.2.4.1 Extraction des MTs

Les larves conservées à -80 °C ont été décongelées sur la glace et ensuite centrifugées (500-800 g ; 5 min 4 °C) pour collecter l'échantillon au fond du tube. Le culot larvaire a été ensuite rincé à l'eau physiologique, ré-centrifugé et ré-suspendu dans un volume minimal de tampon isotonique. La lyse des larves a été réalisée par 0.5 ml d'un mélange de tampon de lyse détergent et d'inhibiteur des protéases pendant 30 à 40 min à 4 °C. Le lysat a été transféré dans un tube eppendorf et centrifugé à 30.000 g ; 20 min ; 4 °C. Ensuite, le surnageant contenant les protéines cytosoliques a été collecté (environ 0.3 ml). 5 µL de surnageant ont été utilisés pour le dosage des protéines totales en utilisant la méthode de [Bradford \(1976\)](#). En raison de la teneur faible en protéines dans les larves (en moyenne de 30 µg/ml), on a procédé à une précipitation des Mts par de l'éthanol. Pour cela, 0,3 ml de surnageant a été transféré dans un tube eppendorf de 1.5 ml sur lesquels 0.315 ml d'éthanol absolu (-20 °C) a été ajouté, mélangé pour quelques secondes et centrifugé pendant 5 min à 16000 g et 4 °C. Ensuite le surnageant a été prélevé délicatement et transféré dans un tube de 2 ml puis 1.5 ml d'éthanol absolu (-20 °C) ont été ajoutés. L'échantillon a été gardé pendant 60 min à -20 °C puis centrifugé à 12000-16000 g ; 5 min et 4 °C. Enfin le surnageant a été jeté et le culot a été ré-suspendu dans 50 µl d'une solution de ré-suspension.

3.2.4.2 Migration sur gel SDS-PAGE

Une gamme de référence standard de Mts a été préparée. 50 µl de chaque échantillon de Mts ainsi que les standards ont été incubé à 65 °C pendant 15 min. Ensuite, 5 µl d'un réactif fluorogénique ont été ajoutés dans chaque tube, qui ont été incubés à 65 °C pendant 30 s puis centrifugé à 10000 g 1 min pour collecter l'échantillon au fond de tube. 55 µl de tampon de charge a ensuite été ajouté, complété de 2-Mercaptoethanol et mis à incuber 5 min à température ambiante. Dans le gel, 0,22 µl de chaque échantillon et de standard ont été chargés dans les puits. Un ensemble de fluorescéine de protéine à faible poids moléculaire appropriée pour SDS PAGE a été utilisé.

Le gel de séparation contient 3,3 ml d'acrylamide 30 % ; 1,25 ml de Tris HCl 1,5

M, pH 8,8 / 0.4 % SDS ; 0,1 ml de EDTA 0,1 M ; 2 ml d'eau distillée ; 2 μ l TEMED et 50 μ l d'ammonium persulfate 10 % w/v. Le gel de concentration est composé de 0,85 ml d'acrylamide 30 % ; 2,5 ml de Tris HCl 0.25 M pH 6,8/ 0,2 % SDS ; 1.55 ml d'eau distillée ; 0.1 ml d'EDTA ; 5 μ l de TEMED ; 20 μ l d'ammonium persulfate 10 % (w/v).

La migration est lancée à température ambiante et à 120 V. Quand le front de migration atteint la limite de gel, le gel est transféré dans une boîte à essai sur une plate-forme basculante, lavé 2 fois 2 min avec 200 ml d'eau déminéralisée, puis fixé 2 fois 15 min dans une solution de fixation faite de 30 % (V/v) éthanol, 7,5 % acide acétique. Le gel a été analysé sur une table UV ILLUMINATION.

A la fin, le gel a été démoulé et immergé dans une solution de coloration composée de 0.1 % (w/v) Coomassie brillant blue-R ; 45 % (v/v) de méthanol et 10 % (v/v) d'acide acétique, pendant une heure en agitation continue pour pouvoir visualiser les bandes de protéines. Le bleu de Coomassie est retiré et le gel est immergé dans une solution décolorante composée de 40 % (v/v) méthanol et 10% (v/v) acide acétique pendant 15 min sous agitation, jusqu'à ce que les bandes soient nettes. Le gel est ensuite immergé pendant une nuit dans de l'eau distillée. Le logiciel Image-Lab (Image-Lab™ software (BioRad)) détecte les bandes à partir de la photo du gel et compare leur épaisseur et leur intensité afin de déterminer la concentration en MTs.

3.2.5 Étude Biochimique

3.2.5.1 Préparation de la fraction subcellulaire :

Les larves ont été décongelées sur glace et ensuite homogénéisées à l'aide d'un « UltraTurrax® tissue homogenizer » (800 tr/min, 4 °C) dans un tampon phosphate (1 :3 (v :v) ; 0,1 M ; pH 7,5). L'homogénat obtenu est ensuite centrifugé à 10.000 g pendant 20 min. Tous les procédés de préparation ont été effectués à 4 °C. Après centrifugation, le surnageant (fraction S9) a été divisé en plusieurs aliquotes et conservés à -80 °C pour l'analyse ultérieure des biomarqueurs (CAT, GST, SOD, AChE et MDA). Tous les essais ont été réalisés en triplicats.

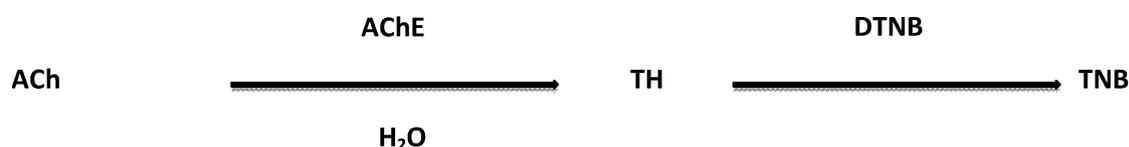
3.2.5.2 Dosage des protéines :

La concentration des protéines a été mesurée dans la fraction S9 des larves selon la méthode de [LOWRY et al. \(1951\)](#) adapté pour le dosage en micro-plaque et en utilisant l'Albumine de Sérum Bovin (BSA) comme standard. Les protéines ont été dosées à l'aide d'un spectrophotomètre à lecteur de micro-plaques (Synergy HT, BioTek), et exprimée en $mg.mL^{-1}$.

3.2.5.3 Dosage de l'activité Acétylcholinestérase (AChE)

L'AChE a été mesurée dans la fraction S9 de larve selon la méthode d'Ellman *et al.* (1961) adaptée pour la lecture en micro-plaque.

Cette méthode se base sur l'hydrolyse d'un ester de choline; l'acétylcholine (ACh) par l'acétylcholinestérase (AChE). La thiocholine (TH) libérée réagit avec le 5-5'-dithio-bis (2-nitrobenzoate) (DTNB) pour former le 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB), produit de couleur jaune qui absorbe à une longueur d'onde de 412 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente dans le milieu.



L'absorbance à 412 nm a été suivie pour tous les échantillons et les blancs à un intervalle de 51 secondes pendant 5 minutes en utilisant un spectrophotomètre à lecteur de micro-plaques (Synergy HT, BioTek).

L'activité spécifique de l'AChE est exprimée en nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines totales en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 13,6 mM⁻¹.cm⁻¹. La formule utilisée pour calculer l'activité AChE est la suivante :

$$\text{Activité AChE (nmol/min/mg P)} = ((\Delta \text{ DO/min})/\text{P}) \times (1000/\varepsilon)$$

$\Delta \text{DO/min}$: variation de la densité optique (DO essai – DO blanc) par minute

P : quantité de protéine dans le puits (mg)

ε : coefficient d'extinction molaire de l'acétylcholinestérase égale à 13.6 mM⁻¹.cm⁻¹.

3.2.5.4 Dosage de l'activité catalase :

Les catalases sont des enzymes qui interviennent dans la défense de la cellule contre le stress oxydatif en éliminant les espèces réactives de l'oxygène (EROs) et en accélérant la réaction spontanée de dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) toxique pour la cellule en eau et en oxygène. La technique utilisée est celle décrite par Claiborne (1985), elle consiste à suivre la disparition de l'eau oxygénée par action de la catalase selon la réaction suivante :

Catalase



L'activité catalase a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UVIKON 933 (BioTek) en suivant la diminution de la densité optique pendant 30 secondes à intervalles de 5 secondes et à une longueur d'onde 240 nm. Dans une cuve en quartz on introduit dans l'ordre 1,5 ml de tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,5 à 25 °C), 200 µl de H_2O_2 (500 mM) et enfin 20 µl de l'extrait brut contenant l'enzyme.

L'activité spécifique de la catalase est exprimée en nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines totales et la formule utilisée pour sa détermination est la suivante :

$$\text{Activité catalase } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mgP}) = ((\Delta \text{DO}/\text{min})/\varepsilon \times \text{P})$$

$\Delta\text{DO}/\text{min}$: variation de la densité optique (DO essai – DO blanc) par minute
 P : quantité de protéine dans la cuve (mg).

ε : coefficient d'extinction moléculaire de l'eau oxygénée à 240 nm égale à 0.04 mM⁻¹.cm⁻¹.

3.2.5.5 Dosage de l'activité Glutathion-S-Transférase :

L'activité de la Glutathion-S-Transférase (GST) a été mesurée par la méthode spectrophotométrie de [Habig et al. \(1974\)](#). Le principe du dosage est basé sur la mesure de la cinétique d'apparition du thioéther formé lors de la conjugaison du substrat 1-chloro 2, 4-dinitrobenzène (CDNB) avec le glutathion réduit (GSH) utilisé comme cofacteur.

Dans les cuves, on introduit dans l'ordre : 1 ml du tampon phosphate; 50 µl de la solution de CDNB; 50 µl de l'extrait brut contenant l'enzyme et enfin 50 µl de glutathion réduit (GSH) pour déclencher la réaction. La variation de la densité optique est suivie pendant 2 minutes à un intervalle de 30 secondes contre une solution ne contenant pas l'échantillon à doser (blanc). La densité optique est mesurée à 340 nm à l'aide du spectrophotomètre UVIKON 933 (BioTek).

L'activité spécifique de la GST est exprimée en nmole.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines totales, elle est calculée par la formule suivante :

$$\text{Activité spécifique de la GST} = (\Delta \text{DO}/\text{min} \times 1000) / (\varepsilon \times \text{P})$$

3.2.5.7 Mesure de la peroxydation lipidique

La mesure de la peroxydation lipidique est effectuée sur la fraction S9 des larves par quantification de la concentration des substrats de l'acide 2-thiobarbiturique (TBARS) en utilisant la méthode de [Buege & Aust \(1978\)](#) adaptée à la lecture par micro-plaque. Cette mesure est basée sur les propriétés de certains composés comme le Malonedialdéhyde, de réagir avec l'acide Thio-barbiturique (TBA) pour générer un produit coloré qui absorbe à une longueur d'ondes de 530 nm.

Dans un tube eppendorf, on introduit 250 µl de S9 et 250 µl d'une solution contenant de l'acide trichloracétique à 20 % (TCA) et de la butylhydroxytoluène à 2 % (BHT). Puis le mélange est centrifugé 15 min à 10000 rpm. Ensuite, 450 µl de surnageant est chauffé à 80 °C pendant 1 heure dans une solution contenant 90 µl de HCL 0.6N et 360 µl de Tris-TBA (25 mM – 100 mM). Les tubes sont ensuite refroidis et l'absorbance à 530 nm est suivie en utilisant un spectrophotomètre avec lecteur de micro-plaques (Synergy HT, BioTek).

Le taux de TBARS a été évalué en utilisant le 1, 1, 3, 3-Tétraméthoxypropane (TMP), comme standard de référence. Pour cela une gamme étalon a été réalisée et traitée dans les mêmes conditions.

Les résultats sont exprimés en nmoles de MDA équivalent par milligramme de protéines.

3.2.6 Évaluation de niveau d'altération de l'ADN : test des comètes

L'effet génotoxique du cuivre et de l'argent ainsi que celui de la température chez les stades de développement précoces de la de moule méditerranéenne a été évalué au cours des travaux de cette thèse. Une substance (chimique ou naturelle) est dite génotoxique quand elle est capable de compromettre l'intégrité physique (cassure chromosomique) ou fonctionnelle du génome. Le niveau d'altération de l'ADN a été évalué par le test des comètes (Single Cell Electrophoresis en anglais) qui est une technique simple, rapide et intégrative d'évaluation quantitative des dommages à ADN. Sa version alcaline développée par [Singh et al. \(1988\)](#) permet la détection à la fois des cassures simple et double brins de l'ADN ainsi que les sites alkali-labiles.

Le test des comètes est réalisé sur des cellules individualisées. Pour cela un protocole de dissociation cellulaire des larves de moule par action enzymatique a été développé au sein du laboratoire en s'inspirant du protocole développé chez les larves d'huitre ([Akcha et al., 2012](#); [Mai et al., 2012](#)). Cette étape est faite sur un pool de 100 000 larves trochophore (24 h après fécondation) avant formation de la coquille. Plusieurs conditions ont été testées pour mettre au point le protocole ci-dessous.

3.2.6.1 Dissociation cellulaire

Des larves au stade trochophore (24 h après fécondation) sont filtrées sur un tamis à 40 µm et récupérées dans un volume minimal d'eau de mer filtrée tenue à la température d'exposition. Les larves sont ré-suspendues dans un volume de RPMI de façon à avoir 12 000 larves/mL. Ensuite, pour 1 mL de larves on ajoute 1 mL de l'enzyme dispase II (2.4 U ; 50 mM Hepes/KOH pH 7.5 ; 150 mM NaCl) pour avoir une concentration finale de l'enzyme de 1.2 U/mL. Le mélange est mis à incuber 45 min, à 37 °C et 150 rpm. Pour stopper la réaction enzymatique, les échantillons sont directement placés sur de glace pilée et une centrifugation 10 min ; 1000 rpm ; 4 °C est immédiatement réalisée. La viabilité cellulaire a été vérifiée sur cellule de Malassez avec 2 µl d'une solution de Bleu de Trypan à 1 mg/mL dans un volume de 20 µL de suspension cellulaire. Les cellules colorées en bleu sont considérées mortes. Il faut que la viabilité cellulaire soit supérieure à 80 % pour que la suspension cellulaire soit utilisée. La densité cellulaire est déterminée puis le culot cellulaire est ré-suspendu dans un volume de RPMI pour obtenir une concentration cellulaire d'environ 25×10^5 cellules/mL.

3.2.6.2 Le test des comètes

Le test des comètes est réalisé directement après la dissociation cellulaire car les cellules ne peuvent pas être conservées pour utilisations ultérieures. Le protocole adopté est celui de [Singh et al. \(1988\)](#) avec quelques modifications. Deux approches de test des comètes ont été réalisées : une classique et une modifiée en utilisant une enzyme de réparation « formamidopyrimidine DNA glycosylase » (fpg). Cette dernière est recommandée par l'European Standards Committee on Oxidative DNA Damage (ESCODD) et permet la détection des dommages oxydatifs de l'ADN ([Collins et al., 1996](#); [Woźniak & Błasiak, 2002](#)).

Les premières étapes sont les mêmes pour les deux versions du test des comètes :

50 µL de suspension cellulaire sont ajoutés à 100 µL d'agarose à faible point de fusion LMPA (low melting point agarose) à 0,75 %. Ensuite, le dépôt de 50 µL de ce mélange est réalisé deux fois sur les deux extrémités d'une lame préalablement recouverte d'une mince couche de NMPA (normal melting point agarose) 0,8 %. Des lamelles 18 x 18 mm sont ensuite déposées sur les gels pour uniformiser l'étalement des deux dépôts. Les gels sont ensuite mis à durcir 5 min à 4 °C. Puis, les lamelles sont retirées délicatement et une nouvelle couche de LMPA est ajoutée sur chacun des gels et de nouveau recouvert d'une lamelle. Après durcissement pendant 5 min à 4 °C, les lamelles sont définitivement retirées et les lames sont placées dans une solution de lyse alcaline préparée la veille (2,5 M NaCl ; 0,1 M EDTA ; 0,01 M Tris ; pH ajusté à 10 avec NaOH) pendant 1h30 à l'abri de la lumière pour éviter au maximum toute photo-dégradation de l'ADN. Un pourcent de Triton

X-100 est ajouté extemporanément à la solution. Au bout de 1h30, les lames sont trempées 3 fois pendant 5 min dans le tampon de l'enzyme. Après, ils sont placées dans le tampon de l'enzyme à 37 °C, et 12 µl d'enzyme sont ajoutés. Les lames, qu'elles soient destinées au traitement fpg ou non sont incubées 30 min à 37 °C. Ensuite, Les lames sont placées à l'horizontal dans une cuve d'électrophorèse et couvertes d'un tampon d'électrophorèse fraîchement préparé (0,3 M NaOH ; 1 mM EDTA ; pH > 13) pendant 40 min pour permettre le déroulement alcalin c'est à dire la dénaturation et la distorsion de l'ADN ainsi que l'exposition des sites sensibles (dont sites alcali-labiles et des sites de réparation incomplète par excision) aux agents alcalins. L'électrophorèse est immédiatement lancée après le traitement alcalin, elle s'opère à 25 V, 300 mA pendant 25 min. Puis, les lames sont rincées trois fois dans une solution de neutralisation (0,4 M Tris ; pH = 7,5) pendant 5 min à 4 °C. Pour finir, les lames sont déshydratées dans de l'éthanol absolu à -20 °C pendant 20 min et séchées à température ambiante.

3.2.6.3 Lecture des lames

Au moment de la lecture, 20 µL d'une solution de bromure d'éthidium (BET), agent intercalant permettant la révélation de l'ADN, sont déposés sur chaque gel et recouverts d'une lamelle 20x20 mm. L'observation des comètes (Figure 3.2.5) s'effectue ensuite grâce à un microscope à épifluorescence (Olympus, grossissement 400x) équipé d'une caméra CDD à niveau de gris (Zeiss). Les lames sont codées et lues aléatoirement à l'aide du logiciel Comet assay IV software (Perceptive instruments, Bury St Edmunds, UK). Un nombre de 100 cellules par gel est analysé et les dommages à l'ADN sont exprimés en pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (le pourcentage d'ADN ayant migré hors du noyau qui forme la tête de la comète). Les noyaux fortement endommagés donnant lieu à des comètes présentant une tête très petite voire inexistante et une longue queue diffuse sont appelées cellules « hedgehog ». Ces cellules n'ont pas été prise en compte lors de la mesure des comètes, comme le recommande [Kumaravel et al. \(2009\)](#), afin de ne pas dépasser les capacités de mesure du système d'acquisition d'image ce qui engendrerait des mesures aberrantes. Les cellules « hedgehog », considérées comme le résultat de cellules apoptotiques ou nécrotiques ([Olive & Banáth, 1995](#)), ont néanmoins été dénombrées sur un total de 100 cellules par gel.

3.2.7 Analyse du comportement natatoire des larves de la moule :

L'exposition des organismes à un stress toxique peut induire des changements rapides de leurs comportements, même à des concentrations bien en dessous des niveaux toxiques ([Amiard-Triquet, 2009](#)). Dans ce contexte, un outil d'analyse de

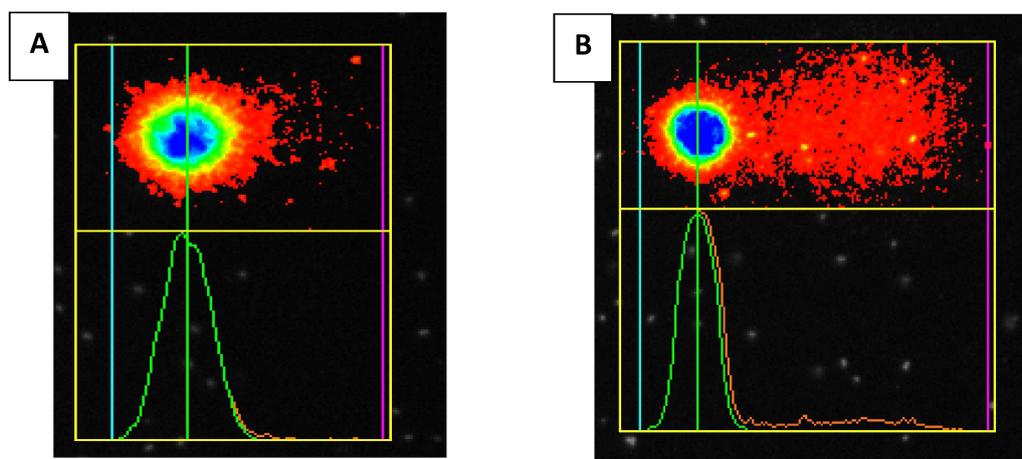


FIGURE 3.2.5 – Exemples de noyau d’ADN sans cassure (témoin) (A) et avec cassure (queue de la comète) (B). Sur cette figure, des cellules dissociées selon le protocole décrit provenant de larves trochophore de moule.

comportement de larve-D de moule a été développé dans la cadre de cette thèse de doctorat dans le but d’évaluer l’effet des polluants chimiques et thermiques sur le comportement natatoire des larves-D. Pour cela différents paramètres ont été étudiés : la vitesse de nage maximale et moyenne ainsi que les différentes trajectoires effectuées selon les conditions d’exposition (effet température, effet des métaux seuls ou en combinaisons et effet de température en combinaison avec les métaux).

L’analyse a été effectuée par le logiciel Image-J, un plugin et une macro spécifiques pour les larves de moules ont été développés par Alicia Romero-Gomez (Laboratoire EPOC, équipe ECOBIOC). L’analyse de comportement se déroule en trois étapes principales : l’acquisition des vidéos, la conversion des vidéos et enfin l’analyse des vidéos.

3.2.7.1 Acquisition vidéo pour analyse du comportement des larves de la moule

Des embryons de moules (environ 250) juste fécondes ont été exposés à une concentration de Cu (CE20), une concentration d’Ag (CE20) et au mélange des deux contaminants (CE10 Cu + CE10 Ag) et à différentes températures (18, 20 et 22 °C). Les expositions ont été effectuées dans des micro-plaques de 24 puits pendant 48 h jusqu’à atteindre le stade larve-D. Différentes séries d’expériences ont été menées avec un couple à chaque fois et pour chaque série plusieurs vidéos ont été réalisés (minimum 3). Après 48 h d’exposition et avant de fixer définitivement

les larves-D, des vidéos de 2 min ont été réalisées au grossissement x 100 à l'aide du microscope Nikon Eclipse et du logiciel d'acquisition NIS Elément D. Le taux de fps (frames per second) doit être de 5 fps correspondant au taux de rafraîchissement de l'écran ou nombre d'images par seconde. Il faut aussi que le vidéo soit de type « MJPEG compressée » qui assure une qualité d'image suffisante pour l'étude de la trajectoire et réduira aussi la taille du fichier de sortie. De plus la taille du fichier doit être « Original ».

3.2.7.2 Conversion des vidéos pour analyse du comportement des larves de moule

Cette étape permet de convertir les vidéos dans un format (AVI) compatible avec le logiciel d'analyse de comportement : Image-J. La conversion a été réalisée par le logiciel en libre accès Virtual Dub (<http://www.virtualdub.org/>). Ce logiciel permet de convertir les vidéos un par un mais quand on a des centaines de vidéos à analyser cette façon n'est pas pratique. Pour cela, un « Job file » a été développée par Alicia Romero-Gomez (Laboratoire EPOC, équipe ECOBIOC) qui permet de lancer la conversion de toutes les vidéos en même temps.

3.2.7.3 Analyse de comportement des larves de moule par Image-J

Le logiciel Image-J a été choisi pour traiter le comportement larvaire des moules, il s'agit d'un logiciel de traitement d'images d'accès libre écrit en Java par le National Institute of Health (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>). Pour cela, une macro spécifique pour les larves des moules a été développée par Alicia Romero-Gomez. Dans la macro développée, les films sont séparés en séquences d'images. Chaque image est rendue binaire en appliquant un « seuillage » automatique sur la base de l'entropie de leur histogramme. Après, une détection de larves est lancée. Cette recherche va sélectionner les objets plus grands que 400 pixels et plus petits que 1500 pixels. Chaque larve qui passe dans le champ de l'analyse, peut soit suivre sa propre trajectoire ou appartenir à la trajectoire précédemment initiée par une autre larve.

Dans le deuxième cas, l'objet trouvé doit avoir la même taille (à 50 pixels près) et être situé à moins de 100 pixels de la dernière larve appartenant à la trajectoire sélectionnée. La macro permet aussi de dessiner les trajectoires sur un plan pour faciliter leur visualisation. Elle permet aussi le calcul de la vitesse de nage maximale ; distance parcourue ; temps de nage ; aire de l'individu considéré ; périmètre de l'individu considéré ; visualisation des trajectoires empruntées par chaque individu.

3.3 Comparaison de la sensibilité des larves de 3 espèces de moule : *M. galloprovincialis*; *M. edulis* et leurs hybrides aux stress thermique et métallique

Une étude a été menée sur des larves-D de 3 espèces de moule : *M. galloprovincialis*; *M. edulis* et leurs hybrides dans le but de comparer leurs sensibilité face au changement global. Pour cela des œufs des deux espèces justes fécondés ont été mis à incuber à différentes températures : 18, 20, 22 et 24 °C. Ces températures déjà testées sur les larves de la moule méditerranéenne ont été appliquées à des larves de la moule commune et les hybrides des deux espèces : Femelle *M. galloprovincialis* fécondées par Mâle *M. edulis* et Femelle *M. edulis* fécondées par Mâle *M. galloprovincialis*. Pour comprendre et comparer au mieux la sensibilité des différentes espèces exposées aux métaux, on a choisi de contaminer les larves des différentes espèces à la concentration efficace médiane EC50 du cuivre et de l'argent ainsi que les EC25 des deux métaux (pour les appliquer en mélange) chez la moule méditerranéenne. Le test embryo-larvaire de toxicité a été utilisé pour mettre en évidence les paramètres à évaluer. Le principe est le même que celui détaillé pour *M. galloprovincialis* au début de cette partie.

3.4 Analyse statistique

Les différentes analyses effectuées, au cours de ce travail de thèse, ont été au minimum réalisées avec 3 réplicats biologiques (larves issues d'un seule couple de géniteurs) et 3 réplicats techniques. Les données sont représentées par des moyennes \pm Ecart-Type (ET). Les données expérimentales ont été initialement testées pour la normalité sur résidus. Ensuite, l'homogénéité de la variance a été vérifiée par le test de Levène ($p < 0,05$). Dans le cas de variances homogènes et de normalité des données, une analyse Anova a été effectuée sur les données suivie d'un test post-hoc de Tukey. Dans le cas contraire, les données ont été analysées par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Le coefficient de corrélation de Pearson a également été calculé afin d'étudier les relations entre les données. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (<http://cran.r-project.org/>) et du logiciel Statistica 6 (StatSoft, ÉtatsUnis).

Résultats et discussions

Chapitre 4

Étude de la sensibilité des stades embryo-larvaires de la moule méditerranéenne *Mytilus* *galloprovincialis* à la pollution métallique et à l'augmentation de la température

4.1 Introduction

La grande majorité des invertébrés marins vivent et se reproduisent dans les zones côtières polluées par différents types de produits chimiques y compris les métaux lourds. Cela peut provoquer des altérations à différents niveaux d'organisation biologique (Devi et al., 1996).

Le cuivre est un élément naturel essentiel qui joue un rôle important dans les fonctions vitales de l'organisme (Szczypkas et al., 1994). Cependant, des concentrations élevées de ce métal peuvent être très toxiques (Viarengo, 1989; Negri et al., 2013). Du fait de ses propriétés électrique, thermique et physique, les utilisations du cuivre sont multiples : fils et câbles électriques, tuyaux d'alimentation en eau, protection du bois, fongicides, pigments et les agents anti-salissures, additifs nutritionnels pour les animaux, etc. . . (Reichelt-Brushett & Harrison, 2005; Alsterberg et al., 2007; Okoro et al., 2011). De ce fait les concentrations de ce métal en milieu marin sont en constante augmentation depuis quelques années, en particulier dans les écosystèmes côtiers. Dans les écosystèmes aquatiques, la concentration en cuivre varie de 0,2 à 30 µg/L dans la colonne d'eau, mais elle est généralement inférieure à 5 µg/L (Willis & Bishop, 2016)

L'écosystème marin est également contaminé par des métaux-traces non essentiels tels que l'argent (Ag). L' Ag^+ s'est avéré être l'un des métaux lourds les plus toxiques pour les invertébrés aquatiques (Lam & Wang, 2006). Les sels d'argent sont largement utilisés comme agents antimicrobiens, en particulier le nitrate d'argent ($AgNO_3$) (Mai et al., 2012). Il a été utilisé pendant des décennies dans un certain nombre d'activités anthropiques, telles que l'exploitation minière et le traitement photographique, et comme biocide et antimicrobien notamment dans les textiles (Bianchini et al., 2005; Suárez et al., 2010; Behra et al., 2013; Zhang et al., 2014). La concentration d'argent dans l'eau varie de 0,01 µg/L dans les zones non polluées à 0,01-0,1 µg/L dans les zones urbaines et industrialisées. Des concentrations beaucoup plus élevées (8,9 µg/L) ont été mesurées dans la baie de Galveston, aux États-Unis » et jusqu'à 260 µg/L près des rejets de déchets de fabrication photographique (Howe & Dobson, 2002).

Les études sur les interactions toxiques des métaux lourds ont révélé l'existence d'effets additifs, d'effets synergiques et d'effets antagonistes (Wu et al., 2008). En outre, le réchauffement climatique représente un stress supplémentaire pour les écosystèmes côtiers. Les températures de l'eau de surface devraient augmenter notamment dans les prochaines décennies entre 1,4 °C et 3,1 °C et entre 2,6 °C et 4,8 °C selon les simulations RCP 6.0 et RCP 8.59 du GIEC (IPCC, 2014) et auront un impact sur la vie marine si le stress thermique approche ou dépasse les limites de la tolérance thermique (Hofmann & Todgham, 2010). La reproduction des invertébrés marins est très sensible à la température, un facteur clé pour le frai et le

développement des gamètes et des larves d'invertébrés (Thorson, 1950). Les invertébrés aquatiques sont particulièrement sensibles aux fluctuations de température en raison de leur caractère ectotherme (Pat et al., 2000).

Parmi les espèces marines, la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* est très utilisée dans les programmes de surveillance environnementale. En raison de leur large distribution, de leur mode de vie sessile, de leur alimentation par filtration et de leur tolérance à une large gamme de conditions environnementales, cette espèce a été largement utilisée comme organisme sentinelle pour la biosurveillance de la pollution marine (Banni et al., 2007; Viarengo et al., 2007). La tolérance de *M. galloprovincialis* vis-à-vis les polluants chimiques diffère selon les stades de vie, mais les stades embryo-larvaires sont les plus sensibles (His et al., 1999b). Les réponses biochimiques, physiologiques et moléculaires des adultes ou des juvéniles de *M. galloprovincialis* aux facteurs de stress environnementaux ont déjà été bien documentées (LeBlanc et al., 2005; Attig et al., 2014b; Banni et al., 2014a,b).

Bien que les tests embryo-larvaires de toxicité aiguë sur les mollusques bivalves soient largement utilisés pour évaluer la toxicité chimique et la qualité de l'eau ou des sédiments (His et al., 1999b; Geffard et al., 2001a; Beiras & Albentosa, 2004; Quiniou et al., 2005; Fabbri et al., 2014a), les données sur les effets des polluants en combinaison avec d'autres facteurs de stress physico-chimiques sur les premiers stades de développement des bivalves sont plus limitées (Deruytter et al., 2015).

Cette étude vise à étudier les impacts de l'augmentation de la température et de la pollution des métaux sur le développement embryo-larvaire de *M. galloprovincialis*. Le test embryo-larvaire sur *M. galloprovincialis* a été utilisé pour (1) évaluer l'effet d'une augmentation modérée de la température de l'eau sur le développement embryonnaire, (2) déterminer l'embryotoxicité du cuivre et de l'argent seuls et en mélange et (3) et d'étudier l'exposition combinée aux métaux et à l'augmentation de la température.

4.2 Protocole expérimental

4.2.1 Produits chimiques utilisés et eau de mer

Le sulfate de cuivre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, CAS 7758-99-8, 99,999 %) et le nitrate d'argent ($AgNO_3$, CAS 7761-88-8, 99,999 %) étaient de qualité analytique et ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). L'eau de mer a été prélevée dans le Banc d'Arguin (Baie d'Arcachon, sud-ouest de la France). Immédiatement après l'échantillonnage, on a filtré l'eau de mer en utilisant un filtre à membrane de pores de 0,22 μm et on l'a stockée à 4 °C dans l'obscurité.

4.2.2 Analyses physique et chimique

Le niveau d'oxygène dissous, la salinité et le pH de l'eau ont été mesurés pour chaque condition. Les solutions de contamination ont été analysées chimiquement pour confirmer les concentrations de métaux. Des aliquotes de solutions mères, des solutions de contamination et d'eau de mer filtrée (FSW), de 50 mL chacune, ont été acidifiées à 5 % (v/v) avec de l'acide nitrique (acide Nitrique à 65 %, Fluka). Tous les échantillons ont été analysés par Spectrométrie d'émission optique couplée au plasma inductif (ICP-OES 720, Agilent Technologies) à l'exception de l'eau de mer de référence et de la dose testée la plus faible d'Ag et de Cu qui ont été analysées par spectrométrie d'absorption atomique à four (Varian SpectrAA 240Z, Agilent Technologies, Clara, USA). Les détails des analyses ont été décrits dans la partie Bases méthodologiques.

4.2.3 Les essais de toxicité

Des solutions mères de cuivre (250 mg/L) et d'argent (100 mg/L) ont été préparées dans de l'eau Milli-Q et stockées à 4 °C. Deux séries indépendantes d'expériences ont été réalisées : pour mesurer l'effet d'un métal seul, des aliquotes de cuivre (0,5, 5, 15, 50 et 500 µg/L) et d'argent (0,1, 1, 3, 10, 30 et 100 µg/L) ont été préparées par dilution de la solution stock dans l'eau de mer. Dans une deuxième série d'expériences, des mélanges binaires équitoxiques ont été préparés en mélangeant le Cu et l'Ag à leurs concentrations efficaces EC5, EC10, EC25 et EC50. On a utilisé l'eau de mer filtrée comme témoin négatif.

Des adultes *M. galloprovincialis* d'Espagne (moules d'élevage) ont été induits à frayer par stimulation thermique. Les moules sont placées alternativement pendant 30 minutes dans un bain d'eau froide (15 °C) puis dans un bain d'eau chaude (20 °C). Dès l'émission de leurs gamètes, les géniteurs ont été isolés dans des béchers en verre contenant 250 ml d'eau de mer filtrée. La qualité des gamètes a été évaluée sous microscope puis ils ont été tamisés séparément pour éliminer les débris. La fécondation a lieu par ajout de quelques millilitres de la solution de sperme dans la solution contenant les ovocytes. Le test embryo-larvaire de toxicité utilisé dans la présente étude a été décrit en détail par (His et al., 1999b; Quiniou et al., 2005; AFNOR, 2009).

Le succès de la fécondation a été vérifié sous microscope et seuls des lots ayant un succès de fécondation supérieur à 90 % ont été utilisés. Les œufs ainsi fécondés et ayant entamé leur première division sont répartis dans des micro-plaques de 24 puits (Cellstar, Greiner Bio-one) contenant les différents milieux à tester à raison de 2 ml par puits et quatre réplicats par condition étudiée. Le nombre maximal d'embryons par puits est 250 à 300 embryons. Chaque condition est répliquée au minimum trois fois avec trois couples différents. Les micro-plaques contenant les

embryons dans les différentes solutions de contaminant sont ensuite placées dans des enceintes thermo-régulées à l'obscurité pendant 48h jusqu'à atteindre le stade larve-D. Pour l'effet des métaux seuls les micro-plaques ont été incubées à 18, 20, 22 et 24 °C et pour l'effet de mélange seulement à 18, 20 et 22 °C. Après 48h d'incubation, 25 µl de formol à 37 % est ajouté par micro-puits pour stopper le développement. Le pourcentage de larves-D malformées (les arrêts de développement et les larves présentant des défauts de développement) a été déterminé par l'observation et le dénombrement directe de 100 larves sous un microscope inversé (à un grossissement de 400X) équipé d'un appareil photo numérique et un logiciel d'acquisition d'image (Nikon, Inverted Microscope Eclips, TS 100/TS100-F, TS100LED MV/TS100 LED-F MV). Selon AFNOR (2009), le test est validé et les résultats sont considérés comme exploitables si les conditions suivantes sont satisfaites : (1) le pourcentage de larves-D normale était égale ou supérieure à 80% pour les conditions témoins (incubés seulement dans de l'eau de mer filtrée) (Quiniou et al., 2005) et (2) la CE50 du $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ exprimée en Cu^{2+} est comprise entre 6 et 16 µg/L. Quatre répétitions analytiques ont été réalisées pour chaque condition et chaque expérience a été répétée trois fois en utilisant trois couples différents de géniteurs.

4.2.4 l'analyse des données :

Pour l'analyse de l'effet dose-réponse et le calcul des ECx, les données ont été transformées en pourcentage de malformation nettes selon la formule d'Abbott :

$$\text{Percent net abnormalities} = \frac{(\% \text{ treatment abnormal} - \% \text{ control abnormal})}{100 - \% \text{ control abnormal}} * 100$$

Les courbes dose-réponse et le calcul de la concentration efficace (ECx) pour les deux métaux et les mélanges ont été déterminés à l'aide du logiciel REGTOX pour Microtox Excel™ (macro MS Excel REGTOX EV7.0.5.xls). Le logiciel REGTOX est disponible en ligne sur : <http://Eric.Vindimian.9online.fr/> (Vindimian, 2005) utilise une fonction sigmoïde (modèle Hill) pour tracer les courbes dose-réponse. La concentration efficace CEx est définie comme la concentration efficace de toxique provoquant x % de malformation larvaire. Pour le mélange, les unités toxiques (TU) ont été calculées en utilisant les formules suivantes :

- $TU_i = C_i / EC_{50i}$
- $TU_{sum} = \sum C_i / EC_{50i}$

Ci est la concentration de chaque toxique dans le mélange à 50 % de réponse et EC50i la concentration efficace 50% pour chaque toxique testé individuellement (Sprague & Ramsay, 1965). Selon (Broderius et al., 1995), si TUsum égal à $1 \pm 0,2$, l'interaction est considérée comme additive, si TUsum $< 0,8$ l'interaction est synergique et si TUsum $> 1,2$ l'interaction est antagoniste.

Toutes les données sont exprimées en moyenne \pm écart-type (ET). Les pourcentages ont d'abord été transformés avec la fonction $P' = \arcsin P$. P correspond aux données brutes (% d'anomalies) (Legendre & Legendre, 1998). Comme les données ne sont pas normalement distribuées ($p > 0,05$, test de Shapiro-Wilk), les comparaisons statistiques ont été effectuées par le test non paramétrique de Kruskal Wallis. Les différences entre les conditions ont ensuite été testées en utilisant le test post hoc de Kruskal (équivalent du test de Tuckey HSD pour les données non paramétriques). Les différences ont été considérées comme significatives lorsque $p < 0,05$.

4.3 Résultats

4.3.1 Paramètres physico-chimiques

Au cours de l'expérience, la valeur moyenne de salinité était de $31,2 \pm 0,16$ (u.s.i), les niveaux de saturation en oxygène variaient de 99 % à 103,3 % et le pH variait de 7,9 à 8,01. Aucune variation significative du pH et de l'oxygène dissous des FSW n'a été mesurée pendant l'essai.

Le Cu et l'Ag ont été mesurés dans les milieux d'étude, et les concentrations sont globalement proches des concentrations nominales à l'exception de la plus faible dose testée de Cu (Tableau 4.1). Pour cette raison, toutes les valeurs CEx et TU ont été exprimées en utilisant des concentrations nominales.

4.3.2 Effet de la température sur le développement embryo-larvaire de moule *Mytilus galloprovincialis*

L'effet de la température sur le développement embryo-larvaire des moules est présenté dans la Figure 4.3.1. Le taux de malformation minimal ($12,6 \pm 1,6$ %) a été obtenu à 18 °C. A 20 °C, le taux d'anomalies a atteint $16,7 \pm 2,1$ %, mais n'était pas significativement différent de 18 °C. En revanche, le taux de larves anormales a augmenté significativement ($p < 0,05$) à 22 °C ($67,1 \pm 1,8$ %) pour atteindre 100 % à 24 °C.

TABLE 4.1 – Concentrations de cuivre et d'argent dissous dans les solutions de contamination simples et en mélanges à 18 °C.

	Concentration Ag^+ ($\mu\text{g/L}$)			Concentration Cu^{2+} ($\mu\text{g/L}$)		
	Nominale	Mesurée	Récupération (%)	Nominale	Mesurée	Récupération (%)
FSW	< LD			< LD		
Cuivre				0,5	1,49	298
				5	4,97	99,4
				15	13,73	91,53
				50	43,12	86,24
Argent	0,1	< $0,04 \cdot 10^{-3}$				
	1	1,098	109,8			
	3	2,847	94,9			
	10	8,63	86,3			
	30	25,022	83,4			
Mélange						
EC5 Cu + EC5 Ag	0,88	0,51	57,95	4,8	5,83	121,45
EC10 Cu + EC10 Ag	1,47	1,01	68,7	6,67	6,99	104,8
EC25 Cu + EC25 Ag	3,11	2,27	72,99	10,83	10,98	101,38
EC50 Cu + EC50 Ag	6,58	4,84	73,55	17,6	16,55	94,03

DL : la limite de détection est de $0,04 \mu\text{g} / \text{L}$ pour l'Ag et de $0,5 \mu\text{g} / \text{L}$ pour le Cu, FSW : l'eau de mer filtrée de référence

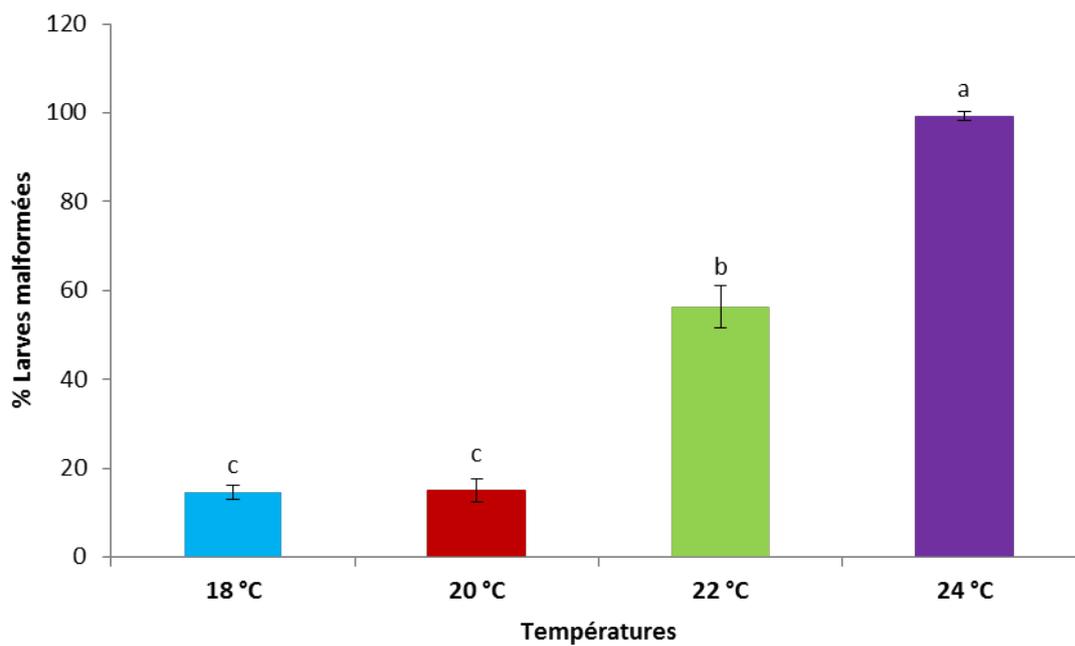


FIGURE 4.3.1 – Pourcentages (moyenne \pm écart-type) de larves D anormales *Mytilus galloprovincialis* exposées à différentes températures. Différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements (N = 3, $p < 0,05$, Kruskal-Wallis)

4.3.3 Toxicité du cuivre ou de l'argent seul

Les effets embryotoxiques de l'exposition des larves *M. galloprovincialis* à chaque métal pris isolément est illustré à la Fig. 4.3.2-A pour le cuivre et Fig. 4.3.2-B pour l'argent. Les deux métaux ont présenté un effet dose-dépendant significatif sur le développement embryo-larvaire (augmentation du taux de larves-D malformées avec l'augmentation de la concentration en métal).

On a observé une embryotoxicité significative ($p < 0,05$) à partir de la concentration la plus faible de Cu ($0,5 \mu\text{g/L}$) et d'Ag ($1 \mu\text{g/L}$) avec respectivement 23,9 % et 19,7 % de larves D anormales. À $50 \mu\text{g/L}$ de cuivre et $30 \mu\text{g/L}$ d'argent, le pourcentage d'anomalies atteint 100 % avec principalement des arrêts de développement. Les valeurs différentes de concentration efficace (CE₅₀) des deux métaux ont été calculées et présentées dans le tableau 4.2. L'argent s'est révélé plus toxique que le cuivre avec une CE₅₀ à 48 h et 18 °C de $6,58 \mu\text{g/L}$ (5,65 - 7,23) et $17,6 \mu\text{g/L}$ (12,49 - 17,72) respectivement.

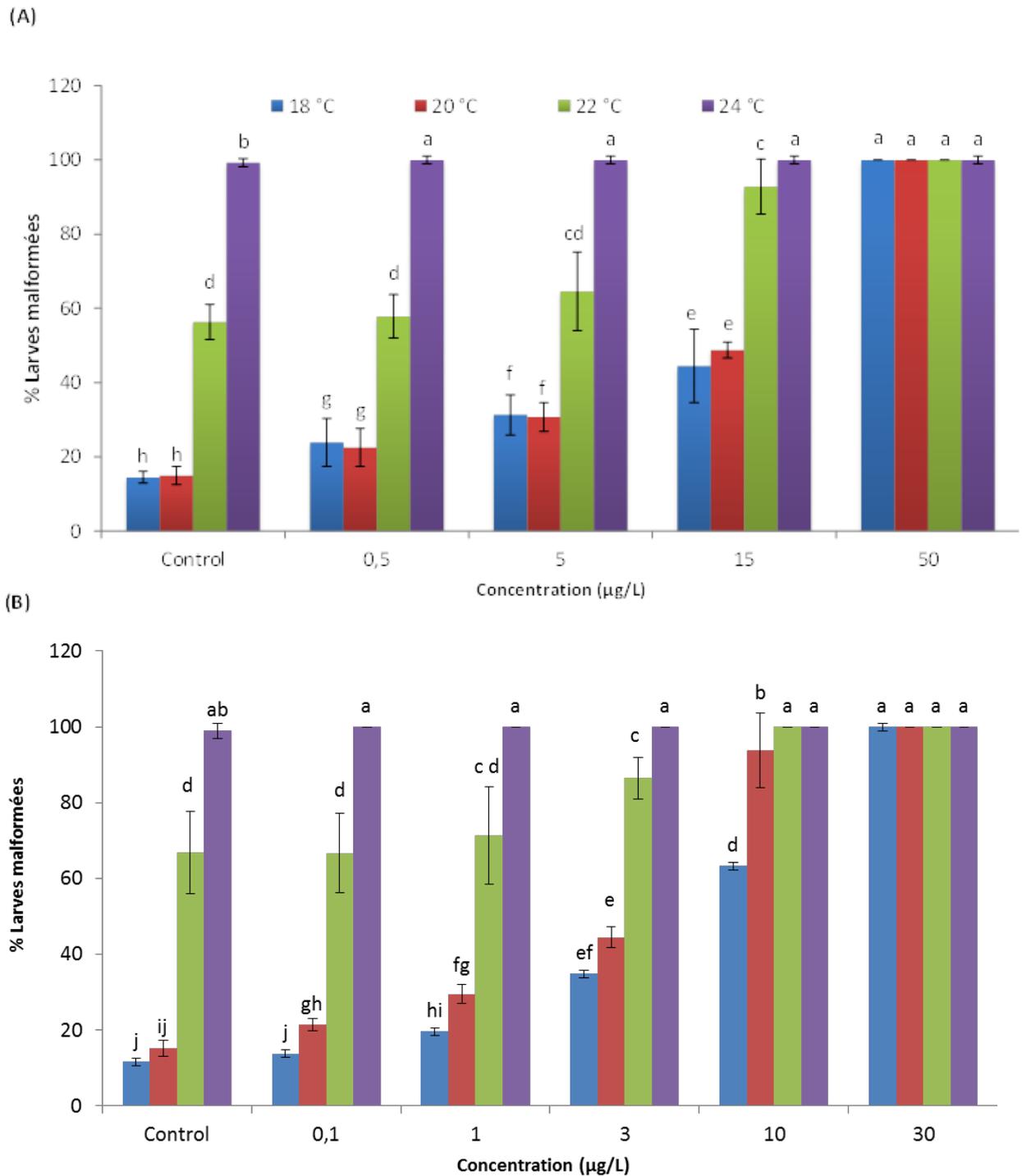


FIGURE 4.3.2 – Pourcentages (moyennes \pm écart-type) des larves D anormales après exposition des embryons de *Mytilus galloprovincialis* à différentes concentrations de cuivre (Cu^{2+}) (A) ou d'argent (Ag^+) (B) et à différentes températures. (N = 3, $p < 0,05$, Kruskal-Wallis).

TABLE 4.2 – Valeurs des CE50-48 h ($\mu\text{g/L}$) avec des intervalles de confiance à 95 %, CE5, CE10, CE20, CE25 de cuivre et d'argent seuls à des températures différentes.

	Température	CE50	CL 95%	CE5	CE10	CE15	CE20	CE25
Cuivre ($\mu\text{g/L}$)	18 °C	17,6	(12,49 – 17,72)	4,8	6,67	8,18	9,54	10,83
	20 °C	16,28	(12,01 – 16,42)	3,92	5,63	7,04	8,33	9,8
	22 °C	8,64	(6,44 – 10,8)	3,18	4,09	4,8	5,4	5,95
Argent ($\mu\text{g/L}$)	18 °C	6,58	(5,65 – 7,23)	0,88	1,47	2,01	2,55	3,11
	20 °C	3,86	(2,94 – 4,04)	0,82	1,21	1,55	1,86	2,17
	22 °C	2,34	(1,86 – 2,8)	0,52	0,77	0,97	1,16	1,34

4.3.4 Toxicité du mélange Cu-Ag

Les effets combinés de l'exposition simultanée des embryons de moules au cuivre et à l'argent sont présentés à la Figure 4.3.3. Une augmentation significative du pourcentage de larves-D malformées ($p < 0,05$) a été observée avec des concentrations croissantes du mélange Cu-Ag à 18 °C. La TUsum calculé pour un mélange équi-toxique de Cu et Ag a donné une valeur de 1,1 indiquant un effet additif des deux métaux (Tableau 4.3).

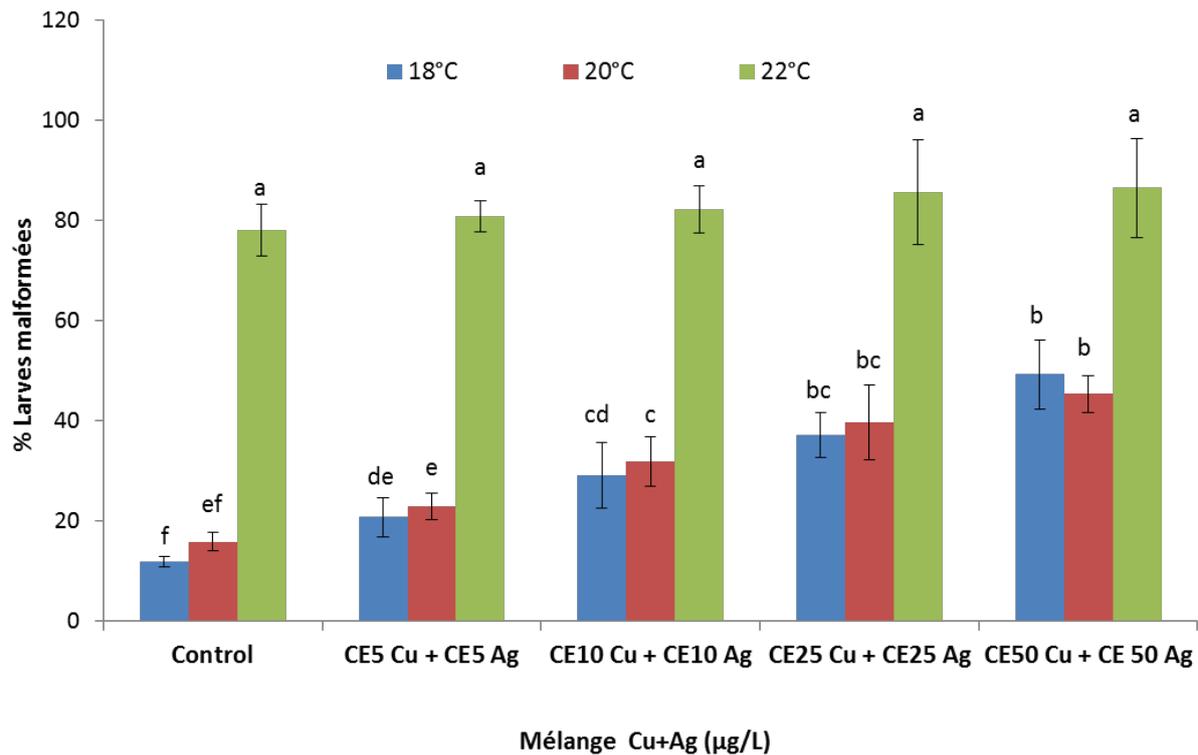


FIGURE 4.3.3 – Pourcentages (moyennes \pm écart-type) de larves D anormales de *Mytilus galloprovincialis* exposées à différentes concentrations de mélanges de Cu-Ag à trois températures. Différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements (N = 3, $p < 0,05$, Kruskal-Wallis).

TABLE 4.3 – 48h-CE50 \pm CI95% ($\mu\text{g} / \text{L}$), CEx ($\mu\text{g} / \text{L}$) et TU pour le mélange d'Ag et de Cu à des concentrations toxiques égales à 50% et à différentes températures.

		Mixture Cu + Ag ($\mu\text{g}/\text{L}$)									
	CE50	CL 95%	CE5	CE10	CE15	CE20	CE25	TUAg	TUCu	TUsum	
18 °C	13,97	(7,34 – 59,73)	2,07	3,36	4,54	5,69	6,85	0,474	0,617	1,091	
20 °C	8,06	(6,55 – 35,08)	2,82	3,69	4,35	4,92	5,45	0,466	0,385	0,851	

4.3.5 Influence de la température sur la toxicité des métaux

L'impact de la température sur la toxicité des métaux a été estimé en analysant la courbe dose-réponse et en calculant les CE50. Le calcul n'a pas été effectué pour le mélange à 22 °C en raison du niveau élevé d'anomalies larvaires (environ 80%) dans tous les groupes (figure 4.3.3). L'élévation de la température a considérablement augmenté la toxicité des deux métaux testés individuellement, comme l'a prouvé la diminution marquée de la CE50 (tableau 4.3). La CE50 pour le mélange était également beaucoup plus faible à 20 °C (8,06 µg/L) comparativement à 18 °C (13,97 µg/L). En outre, la valeur TUsum pour le mélange a également diminué de 1,1 à 18 °C à 0,85 à 20 °C. Au total, ces résultats indiquent clairement qu'une légère élévation de la température de l'eau augmente la sensibilité des larves de moules à la toxicité des deux métaux testés.

4.4 Discussion :

Récemment, de nombreuses études se sont intéressées à l'impact du réchauffement climatique et l'augmentation de température sur la physiologie des invertébrés marins (Hallare et al., 2005; Tomanek, 2010; Byrne, 2011; Callaway et al., 2012; Banni et al., 2014a,b). En raison de leur développement incomplet et de leur taux mitotique et métabolisme élevés, les stades précoces de la vie sont beaucoup plus sensibles que les adultes aux effets sub-létaux de la température, ce qui augmente la probabilité d'anomalies (Byrne & Przeslawski, 2013). Cette étude est l'une des premières à démontrer que l'augmentation des températures a un impact négatif sur le stade larvaire de *M. galloprovincialis*. Au total, nos résultats indiquent que, dans nos conditions contrôlées de laboratoire, les stades précoces de développement de *M. galloprovincialis* sont très sensibles à une élévation modérée de la température de l'eau et que des valeurs supérieures à 22-23 °C nuisent au développement embryonnaire normal de ces moules.

Plusieurs études ont montré que les premiers stades de vie des bivalves sont également très sensibles à l'exposition aux métaux traces (Nadella et al., 2009; Prato & Biandolino, 2010; Gamain et al., 2016b). À ce jour, aucune donnée n'est disponible pour l'Ag. Pour le Cu, Fabbri et al. (2014a) ont indiqué une valeur de CE50 de 8,7 µg/L, tandis que Prato & Biandolino (2010) ont obtenu une valeur plus élevée à 40 µg/L pour la même espèce.

Le Cu est un élément essentiel dont les organismes marins ont besoin à des niveaux faibles, mais il s'avère très toxique en excès (Viarengo et al., 1988; Deb & Fukushima, 2007b; Gomiero & Viarengo, 2014). Dans la présente étude, l'embryotoxicité ($p < 0,05$) du cuivre a été observée à partir de la plus faible concentration testée (0,5 µg/L), et a augmenté avec l'augmentation de la concentration en Cu.

Des résultats similaires ont été obtenus chez des embryons de *Mytilus trossolus* (Fitzpatrick et al., 2008) et *Crassostrea gigas* (Mai et al., 2012; Gamain et al., 2016a,b). Dans le cycle de vie de *Mytilus edulis*, le stade embryonnaire s'est révélé être le stade le plus sensible au cuivre (Hoare et al., 1995a,b). Cela s'explique, au moins en partie, par son taux métabolique élevé et la grande sensibilité des enzymes aux dommages oxydatifs. En effet, toute altération de l'activité enzymatique peut considérablement altérer certaines voies métaboliques et réduire le développement et la survie (Fitzpatrick et al., 2008). Il est intéressant de noter que la plus faible concentration d'effet observé pour le Cu est obtenue à 0,5 µg/L est similaire ou même inférieure aux valeurs de concentration actuellement retrouvées le long des côtes européennes (0,04-4,8 µg/L) (Tueros et al., 2008).

À notre connaissance, ce travail est le premier à évaluer l'embryotoxicité de l'Ag⁺ sur la moule méditerranéenne. Les résultats de la présente étude confirment la forte toxicité de ce métal sur les invertébrés aquatiques. La littérature ne contient que très peu d'études sur la toxicité de l'argent chez les stades embryonnaires des invertébrés aquatiques tels que les bivalves et les oursins (tableau 4.4).

TABLE 4.4 – Toxicité de l'argent (EC50 en µg/L) chez les embryons et les larves de différents invertébrés aquatiques.

Espèces	Critère de toxicité	Concentration Ag (µg/L)	Références
<i>Spisula solidissima</i>	1h-EC50 post fécondation	18	(Zoto & Robinson, 1985)
	48h-CE50	14	
<i>Mercenaria mercenaria</i> (embryon)	48h-CL50	21	(Calabrese et al., 1977)
<i>Rana pipiens</i> (embryon)	CE50	10	(Zuiderveen & Birge, 1996)
<i>Crassostrea virginica</i> (embryon)	48h-LC50	5,8	(Calabrese et al., 1977)
<i>Danio rerio</i>	CE50 6 jours post fécondation	34	(Ašmonaitė et al., 2016)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	48h-CE50 (larve-D)	6,6	Présent travail

L'effet de l'argent ionique sur les larves de moules a été détecté à des concentra-

tions plus faibles que pour la plupart des autres espèces aquatiques, à l'exception de *C. virginica*. Quoi qu'il en soit, ces concentrations sont beaucoup plus élevées que celles actuellement observées dans les zones marines et estuariennes qui sont généralement inférieures à 30 ng/L (Barriada et al., 2007).

Le milieu marin est soumis à un mélange de substances toxiques qui peuvent interagir pour produire des effets nocifs chez les organismes aquatiques. Les effets combinés des mélanges de polluants peuvent être qualifiés de synergiques, antagonistes ou additifs. Nos résultats sont cohérents avec ceux de Martin et al. (1981) qui ont démontré que le cuivre et l'argent interagissent de manière additive sur le développement embryonnaire de l'huître Pacifique *C. gigas*. Les effets des métaux en mélange sont beaucoup plus complexes que le métal unique et de nombreuses hypothèses peuvent expliquer ces résultats divergents. Le mode d'action du cuivre et de l'argent a déjà été documenté (Le et al., 2013; Liu et al., 2014). Il a été signalé que le cuivre affectait la perméabilité de la membrane en augmentant le potentiel de la membrane et en bloquant les canaux ioniques. A des concentrations faibles, les ions argent agissent en bloquant le canal K^+ et à des concentrations plus importantes, ils augmentent la perméabilité membranaire (Coskun et al., 2012). Ceci peut expliquer les effets interactifs observés entre les ions Cu et Ag agissant de la même manière en affectant la perméabilité membranaire et les canaux ioniques. De plus, la toxicité du mélange Cu-Ag peut dépendre des concentrations et combinaisons des métaux (Le et al., 2013; Liu et al., 2014). Selon Lucas & Horton (2014), l'argent a un impact plus important lorsqu'il est combiné avec une faible concentration de cuivre ; si non, le cuivre a des effets délétères prédominants.

L'effet de la température sur la sensibilité des organismes aquatiques aux polluants a déjà été documenté dans le contexte écotoxicologique (Cairns et al., 1975; Tomanek, 2010; Banni et al., 2014a,b). Cependant, seules quelques études ont décrit les effets interactifs entre la température et l'exposition aux métaux à l'état de traces au début de la vie des bivalves. Il a été démontré que chez les invertébrés comme chez les vertébrés, l'interaction température-métal suit une courbe croissante, ainsi l'augmentation de la température tend à augmenter la toxicité des métaux sur les organismes (Cairns et al., 1975). Bat et al. (2000) ont noté que la mortalité de *Gammarus pulex* était augmentée avec l'augmentation des concentrations en cuivre et de la température. Sokolova & Lannig (2008) ont émis l'hypothèse que l'augmentation de la sensibilité des organismes aux métaux à des températures élevées pourrait résulter de l'augmentation de leur solubilité dans l'eau et donc de la biodisponibilité des métaux et de l'augmentation de la contamination par l'augmentation du métabolisme. Cependant, Attig et al. (2014a) ont fourni des preuves de la réduction de la fréquence ventilatoire chez *M. galloprovincialis* exposée à des températures plus élevées, affectant ainsi le taux d'absorption des contaminants.

4.5 Conclusion

La présente étude fournit les premières preuves sur la sensibilité des premiers stades de vie de la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis* à la température de l'eau et à la pollution par l'argent. Une embryotoxicité significative a été observée après exposition à une faible augmentation de température et à des concentrations modérées d'argent et de cuivre. Combiner l'exposition à un faible accroissement de la température de l'eau et à une pollution métallique modérée pourrait affecter les limites de tolérance et nuire au développement et la reproduction de *M. galloprovincialis*. Nos données doivent être soigneusement considérées compte tenu de l'augmentation probable de la contamination des métaux et de la température des eaux dans la zone intertidale de la mer Méditerranée du fait du réchauffement climatique.

Chapitre 5

**Étude du niveau du stress oxydatif
chez les stades de vie précoces de
Mytilus galloprovincialis exposés au
cuivre, à l'argent et à un stress
thermique modéré.**

5.1 Introduction

Les estuaires et les eaux côtières sont particulièrement menacés par la pollution anthropique. Les métaux lourds représentent l'une des formes les plus répandues et les plus graves de contamination de l'environnement (Devi et al., 1996).

Le cuivre (Cu) est un métal essentiel qui peut être nocif lorsqu'il est présent en quantités excessives dans l'écosystème (White & Rainbow, 1985). Le Cu est largement utilisé dans l'agriculture comme fongicide (Okoro et al., 2011). Il est également utilisé comme biocide dans les peintures anti-salissures (Okoro et al., 2011). Le programme de l'Union européenne intitulé Évolution de l'écosystème marin dans un environnement en évolution a déterminé que le cuivre est rejeté dans le milieu marin en grande quantité et qu'il est présent à des concentrations élevées le long de la côte ainsi que dans la colonne d'eau de mer. Sa concentration est souvent particulièrement élevée dans les sédiments (28-233 µg/g) (Haynes & Loong, 2002) et dans les eaux interstitielles (Cevik et al., 2008; Negri et al., 2013). De plus, le Cu s'est révélé très toxique pour les organismes aquatiques, y compris les embryons d'invertébrés (Manzl et al., 2004; Nadella et al., 2009; Mai et al., 2012; Gamain, 2016).

Au cours des dernières décennies, la contamination à l'argent (Ag) a bénéficié d'une attention croissante en raison de ses diverses applications industrielles en tant que biocide, agent antimicrobien dans l'habillement, les produits d'entretien, les cosmétiques et les produits d'hygiène personnelle (Luoma, 2008). L'argent est un métal d'une grande importance pour l'environnement qui s'est avéré avoir des effets toxiques aigus et à long terme sur les organismes aquatiques tels que les microorganismes (Fabrega et al., 2011), les invertébrés (Wang & Rainbow, 2005), particulièrement les bivalves (Gomes et al., 2013) et les poissons (Bruneau et al., 2015). En plus de la production directe de radicaux libres, on soupçonne que l'Ag est à l'origine de l'appauvrissement du système antioxydant (Carlson et al., 2008) et doit donc être considéré, à ce titre, comme un agent pro-oxydant.

L'une des principales craintes de la société actuelle est le changement climatique. Les projections climatiques actuelles prévoient des changements importants dans la chimie des océans et une augmentation de la température de l'air et des océans d'ici 2100. Les températures des eaux de surface devraient augmenter au cours des prochaines décennies entre 1,4 °C et 3,1 °C et entre 2,6 °C et 4,8 °C selon les simulations du GIEC RCP 6.0 et RCP 8.5 respectivement (Ipcc, 2007; IPCC, 2014).

On sait que les métaux lourds et le stress thermique accroissent la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) dans les cellules (Abele et al., 2002; Gill & Tuteja, 2010), augmentant ainsi le risque de dommages oxydatifs. La formation des EROs et les dommages induits sont combattus par des défenses antioxydantes

cellulaires comprenant diverses enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), ainsi que des protéines de faible liaison moléculaire telles que les métallothionéines et le glutathion qui fonctionnent comme des chélateurs de radicaux (Livingstone, 2001; Dondero et al., 2005).

Les mollusques, en particulier le genre *Mytilus spp*, sont utilisés depuis les années 1970 dans les programmes de surveillance pour évaluer la contamination des eaux marines côtières ainsi que les effets biologiques induits (Viarengo et al., 2007; Banni et al., 2009; Canesi et al., 2011). Toutefois, les embryons et les larves d'invertébrés marins sont beaucoup plus sensibles aux substances toxiques que les juvéniles ou les adultes (Ringwood, 1991; His et al., 1999a), et ont souvent été utilisés pour l'évaluation de la pollution marine (His et al., 1999a; Geffard et al., 2001b; Mai et al., 2012).

La présente étude a deux objectifs principaux. Dans un premier temps, et sur la base des séquences d'ADN disponibles pour *M. galloprovincialis*, les niveaux d'expression de onze gènes sélectionnés impliqués dans la réponse antioxydante et dans la transcription des gènes ont été mesurés par PCR quantitative : la catalase (cat) ; la superoxyde dismutase cytosolique (sod), la glutathion s-transférase (gst), les variantes du gène de la métallothionéine (mt-10 et mt20), les variantes des protéines de choc thermique (hsp 27, hsp 70, hsp 90, calréticuline et fk506) et les gènes impliqués dans la transcription (ribol12 et ribos27). Deuxièmement, nous avons cherché à étudier les effets des concentrations sublétales du Cu et de l'Ag sur trois enzymes de stress antioxydant, les activités CAT, SOD et GST ainsi que l'accumulation des métallothionéines et de Malondialdéhyde (MDA) dans les larves D de la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis*.

5.2 Protocole expérimental

5.2.1 Conditions d'exposition

L'évaluation de l'effet toxique des deux métaux modèles, cuivre et/ou argent, a été réalisée en utilisant une concentration de cuivre CE20 Cu = 9,54 µg/L ; une concentration d'argent CE20 Ag = 2,55 µg/L et un mélange des CE10 des deux composés : CE10 Cu = 6,67 µg/L + EC10 Ag = 1,47 µg/L. L'effet de l'augmentation de température, chez les premiers stades de développement de la moule, a été évalué en réalisant les expositions à trois températures différentes : 18 (température optimale de développement pour *M. galloprovincialis*) ; 20 et 22 °C. Le choix de ces conditions a été expliqué dans la partie Bases Méthodologiques.

5.2.2 Analyses réalisées

Les solutions de travail ont été analysées chimiquement pour confirmer les concentrations en métaux. Des aliquotes des solutions de contamination et d'eau de mer de référence, de 50 ml chacune, ont été acidifiées avec de l'acide nitrique final à 5 % (acide nitrique 65 %, Fluka) et stockées à 4 °C jusqu'à l'analyse.

Le contenu en Ag et Cu a été mesuré dans les larves-D après 48h d'exposition. Environ 600 000 larves ont été utilisées issues de trois couples de géniteurs (Tableau 5.1).

Le niveau d'expression génique a été étudié chez des larves-D (48h d'exposition) de 4 couples (4 réplicats biologiques). Environ 40 000 larves ont été utilisées par réplicat et 4 expositions indépendantes ont été effectuées en utilisant les embryons d'un seul couple à chaque fois (Tableau 5.1).

Les analyses biochimiques ont été réalisées chez des larves-D (48h d'exposition) de 3 couples (3 réplicats biologiques). Environ 560 000 larves ont été utilisées par réplicat et 3 expositions indépendantes ont été effectuées en utilisant les embryons d'un seul couple à chaque fois (Tableau 5.1).

Les procédures de prélèvement et de conservation des larves ainsi que les différentes analyses ont été réalisées comme décrites dans la partie Bases Méthodologiques.

5.2.3 Choix des gènes étudiés

Au vu des effets toxiques du cuivre, de l'argent et de la température mis en évidence chez les stades embryo-larvaires de *M. galloprovincialis* (voir chapitre 4), 18 gènes cibles ont été choisis, en fonction des séquences codantes disponibles sur les bases de données, pour évaluer leurs effets au niveau des processus cellulaires dont 11 gènes sont impliqués dans les processus de stress oxydatif et de la transcription des gènes :

- **cat** : est une hémoprotéine qui est produite dans les peroxysomes et agit en décomposant le H₂O₂ en H₂O et O₂.
- **sod** : correspond à une famille de métallo-enzyme (contenant Cu, Zn, Fe, ou Mn), connue pour convertir l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).
- **gst** : est une enzyme de biotransformation de phase II qui catalyse, au niveau du cytosol, la réaction de conjugaison des xénobiotiques à caractère électrophile et de leurs métabolites avec un ligand endogène polaire qui est le glutathion (GSH).
- **mt-10** : une protéine de ménage qui est régulée principalement par des métaux essentiels.
- **mt-20** : joue un rôle dans la détoxification des métaux et comme protéine antioxydante. Elle est induite préférentiellement par des ions toxiques

TABLE 5.1 – Conditions d'exposition et paramètres suivis pour les analyses phénotypique, génotoxique et transcriptomique sur larves D de *M. galloprovincialis*.

Analyses	Nombre des conditions	Nombre des replicats	Nombre des em-bryons/replicat	Temps d'exposition (h)	Paramètres suivis
Concentration en métaux dans les larves	12	3	600 000	48 post fécondation	Bioaccumulation
RT-PCR	12	4	40 000	48 post fécondation	Expression génique
Marqueurs enzymatiques et non enzymatiques de stress oxydatif	12	3	560 000	48 post fécondation	Analyses biochimiques

- **hsp90** : fait partie des protéines de choc thermique de hauts poids moléculaire. Elles interviennent comme protéines chaperonnes lors de la traduction des ARNm en stabilisant et en empêchant un repliement hâtif des protéines. Lors d'un choc thermique, les HSP90 sont synthétisées abondamment et se lient aux séquences hydrophobes des protéines partiellement dénaturées.

- **hsp70** : fait partie des protéines de choc thermique de hauts poids moléculaire. La fonction générale de ces protéines est d'assurer le bon repliement des protéines. Les protéines HSP-70 qui sont synthétisées constitutivement sont responsables du repliement adéquat des protéines nouvellement synthétisées.

- **hsp27** : fait partie de la famille des protéines de choc thermique de faible poids moléculaire (HSPs) la plus largement décrite dans la littérature. C'est l'une des HSPs les plus induites en réponse à un stress cellulaire.

- **calreticuline (crt)** : une protéine résidente du réticulum endoplasmique. La crt est généralement considérée pour remplir deux fonctions principales : la première en tant que modulateur du calcium intracellulaire et la deuxième en tant que chaperonne pour les glycoprotéines nouvellement synthétisées, y compris la classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH I) et la plupart des autres protéines immunitaires.

- **fk506** : une classe d'enzyme peptidyl-prolyl cis/trans isomérase, dont certaines peuvent également fonctionner comme chaperons moléculaires.

- **ribol12** : joue un rôle clé dans la synthèse des protéines. Elle est nécessaire pour l'initiation de la traduction, l'élongation et la terminaison de la synthèse des protéines.

- **ribos27** : la protéine S27 ribosomale semble être impliquée dans la liaison ARN-ADN et peut influencer la transcription génétique

- **cathepsine** : une protéase localisée dans les lysosomes qui participe à l'hydrolyse des protéines introduites dans la cellule par phagocytose ou pinocytose.

- **trypsine** : la trypsine est une peptidase, importante pour la digestion des protéines.

5.2.4 Analyses statistiques

Le logiciel Statistica version 6.0, (Statsoft, Inc. 2002) a été utilisé pour l'analyse statistique. L'homogénéité de la variance (test de Levene) et la normalité de la distribution (Shapiro-Wilk) ont été vérifiées. Ces conditions étant respectées, les analyses statistiques ont été effectuées par analyse de variance (ANOVA). Les différences entre les conditions testées ont ensuite été effectuées en utilisant le test post hoc de Tukey.

5.3 Résultats

5.3.1 Concentration en cuivre et en argent dans l'eau

Pour la contamination avec un métal unique, les concentrations mesurées en argent sont dans les limites de 158 et 178 % des concentrations nominales alors que les concentrations mesurées en cuivre varient de 97 % à 120 %. Pour la contamination du mélange de métaux, les concentrations d'argent mesurées variaient de 92 à 99 % et le cuivre de 97 à 123,6 % (Tableau 5.2).

5.3.2 Bioaccumulation du cuivre et de l'argent dans les larves

Les concentrations de Cu et d'Ag dans les larves de *M. galloprovincialis* après la période d'exposition sont indiquées dans le tableau 5.3. Ces concentrations se sont accrues avec la température avec une bioaccumulation maximale à 20 °C (16,90 µg/g de poids sec pour le Cu et 4,76 µg/g de poids sec pour l'Ag) par rapport à la condition contrôle 18 °C. En revanche, une diminution du contenu en métaux a été observée chez les larves exposées à 22 °C, principalement dans les larves exposées au mélange des deux métaux.

5.3.3 Effets des métaux et du stress thermique sur l'expression géniques des gènes étudiés

L'analyse de l'expression relatives de 11 gènes différents (cat, Cu/Zn-sod, gst, mt-10, mt-20, hsp27, hsp70, hsp90, calréticulin, fk506, ribol12 et ribos27) a été réalisée par PCR quantitative en temps réel sur des larves D [transcrits] et les résultats sont présentés dans le tableau 5.4. On a observé une augmentation significative des taux de transcription de cat, de sod, de gst, des deux isoformes de mt, de hsp70, de hsp90, de ribol12 et de ribos27 à 18 °C chez les larves exposées au Cu, à l'Ag et à leur mélange binaire par rapport aux témoins à 18 °C. Le niveau maximal d'expression a été observé chez les larves exposées au mélange (6,88 fois pour la cat, 5,97 fois pour la sod, 6,42 fois pour gst, 10,74 fois pour la mt-10 et 2,97 fois pour la mt-20). Une induction significative a été observée pour toutes les cibles lorsque les larves ont été exposées à 20 °C et aux différentes conditions de contamination. Cependant, à 22 °C, alors que les gènes codant pour les protéines antioxydantes (cat, sod et gst) présentaient une répression significative en présence de métaux, les cibles mt-10, mt-20, hsp27, calreticulin et fk506 ont été significativement induites par rapport au contrôle (18 °C sans apport de métaux). Une induction significative de ribol12 et ribos27 a été observée à 22 °C sans métaux. A 22 °C et présence du mélange de métaux une répression significative de ribol12,

TABLE 5.2 – Concentrations de cuivre et d'argent dans les solutions de contamination.

		Concentration Ag^+ ($\mu g/L$)		Concentration Cu^{2+} ($\mu g/L$)	
		Nominale	Mesurée	Nominale	Mesurée
Contrôle	18 °C	NA	<LD	NA	<LD
	20 °C	NA	<LD	NA	<LD
	22 °C	NA	<LD	NA	2,623
Cuivre	18 °C	NA	<LD	9,54	9,25
	20 °C	NA	<LD	9,54	11,45
	22 °C	NA	<LD	9,54	9,93
Argent	18 °C	2,55	4,25	NA	<LD
	20 °C	2,55	4,546	NA	<LD
	22 °C	2,55	4,029	158	<LD
Mélange	18 °C	1,47	1,348	92	7,69
	20 °C	1,47	1,412	96	8,24
	22 °C	1,47	1,435	99	7,25

TABLE 5.3 – Accumulation de Cu et d’Ag dans les larves de moule *Mytilus gallo-provincialis* exposées au Cu, à l’Ag et à leur mélange avec un gradient croissant de température.

Température	Condition	Cu µg/g poids	Ag µg/g poids
18 °C	Contrôle	3,38	<DL
	Cu	5,85	<DL
	Ag	2,1	0,73
	Mix	8,33	1,76
20 °C	Contrôle	3,54	<DL
	Cu	16,9	<DL
	Ag	9,6	4,76
	Mix	6,96	2,64
22 °C	Contrôle	2,52	<DL
	Cu	9,38	<DL
	Ag	9,56	1,22
	Mix	4,21	0,83

ribos27, hsp70 et hsp90 a été notée. L’expression de la cathepsine et de la trypsine demeure significativement induite quel que soit la condition.

5.3.4 Effets des métaux et du stress thermique sur les enzymes antioxydantes

Les activités des enzymes antioxydantes CAT, SOD et GST ont été évaluées dans les larves exposées au Cu, à l’Ag et à leur mélange et soumis à un stress thermique modéré (Figure 5.3.1). A la température physiologique de 18 °C, une augmentation significative a été enregistrée pour l’activité GST chez les larves exposées à l’Ag et au mélange binaire. Cependant, une inhibition significative a été observée pour l’activité CAT dans les larves exposées au Cu et au mélange Cu + Ag. Le stress thermique (20 et 22 °C) sans apport de métal augmente considérablement les activités du GST et de la CAT. L’exposition au Cu seul à 20 et 22 °C induit une augmentation significative de la GST et un retour aux valeurs de contrôle pour l’activité CAT. L’exposition à l’Ag et au stress thermique induisent une augmentation significative seulement pour l’activité CAT (22 °C). Les larves exposées au mélange binaire de Cu et d’Ag et au stress thermique ont montré une augmentation significative des activités CAT et GST. Pour l’activité SOD, aucun changement significatif n’a été observé dans les conditions exposées par rapport au témoin (18 °C sans apport en métal), mais l’exposition au Cu a entraîné une augmentation significative de l’activité SOD à 18 et 22 °C par rapport au contrôle

à 18°C.

5.3.5 Effets des métaux et du stress thermique sur l'accumulation de MDA

Les dommages oxydatifs sur les lipides ont été étudiés par l'évaluation de l'accumulation de MDA dans les tissus des larves (Figure 5.3.2). Aucune augmentation ni diminution significative n'a été observée dans les différentes conditions d'exposition par rapport au témoin (18 °C sans apport de métal).

5.3.6 Effets des métaux et du stress thermique sur le niveau des métallothionéines

La teneur totale en protéines Mts a été évaluée chez les larves D exposées au Cu / Ag et à l'augmentation de température pendant 48 heures (figure 5.3.3). Nos données montrent que la teneur en Mts a augmenté de manière significative dans les tissus des larves exposées aux métaux seuls ou en combinaison avec le stress thermique. La teneur en Mts la plus élevée a été mesurée chez les larves exposées au mélange Cu et Ag à 22 °C (augmentation de $5,91 \pm 0,47$ fois par rapport au témoin). L'exposition au Cu a conduit à une augmentation beaucoup plus élevée de Mts que l'Ag indépendamment de la température d'exposition.

TABLE 5.4 – Expression différentielle des gènes d'intérêt, cat, sod, gst, hsp27, hsp70, hsp90, calreticuline, fk506, mt10, mt20, ribbo-L12 et ribo-S27, chez les larves-D de la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis* au cours de l'analyse de l'effet seul ou combiné de la température (18, 20 et 22 °C) et de l'exposition au Cu et/ou à l'Ag.

	18 °C			20 °C			22 °C				
	Cu	Ag	Mix	Contrôle	Cu	Ag	Mix	Contrôle	Cu	Ag	Mix
cat	6,42	4,28	6,88	2,32	7,45	4,08	2,69	2,24	0,48	0,52	0,3
sod	5,44	3,81	5,97	1,95	6,78	5,21	2,39	1,97	0,31	0,58	0,21
gst	3,78	3,11	6,42	1,76	3,88	3,59	2,47	/	0,72	0,92	0,56
hsp27	/	/	2,31	2,69	3,75	3,54	4,79	4,28	7,28	4,52	5,78
hsp70	3,44	2,76	4,78	2,38	3,89	3,46	/	/	/	/	0,57
hsp90	4,87	3,28	4,8	2,42	3,69	3,15	/	/	/	/	0,54
calreticuline	/	/	/	1,87	2,21	3,44	3,48	3,41	3,77	3,82	2,57
fk506	/	/	/	1,94	2,36	2,84	3,11	2,78	3,08	2,46	2,23
mt10	8,48	5,42	10,74	4,55	10,41	6,22	3,14	3,54	9,49	6,79	2,41
mt20	2,18	2,47	2,97	/	6,44	2,72	7,83	/	7,75	5,49	9,73
ribbo-L12	3,77	3,11	4,82	/	2,48	2,68	3,28	0,21	/	/	2,47
ribo-S27	2,85	2,49	3,58	/	2,37	2,13	3,09	0,35	1,95	/	2,82
cathepsine	2,24	2,86	3,82	1,88	2,38	2,43	3,65	3,56	2,47	2,75	4,62
trypsin	2,58	3,47	4,08	1,97	2,19	2,11	3,75	2,89	2,28	2,52	3,57

Les résultats sont présentés sous forme des facteurs d'induction (en rouge) ou de répression (en vert) par rapport au contrôle 18 °C et ont été normalisés par rapport aux gènes de la β -actine, 18S et ribol-27. Un astérisque (*) indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport à la condition contrôle 18 °C selon Pfaffli et al. (2002), n=4. Le symbole signifie l'absence de variation significative de l'expression relative par rapport au contrôle à 18 °C.

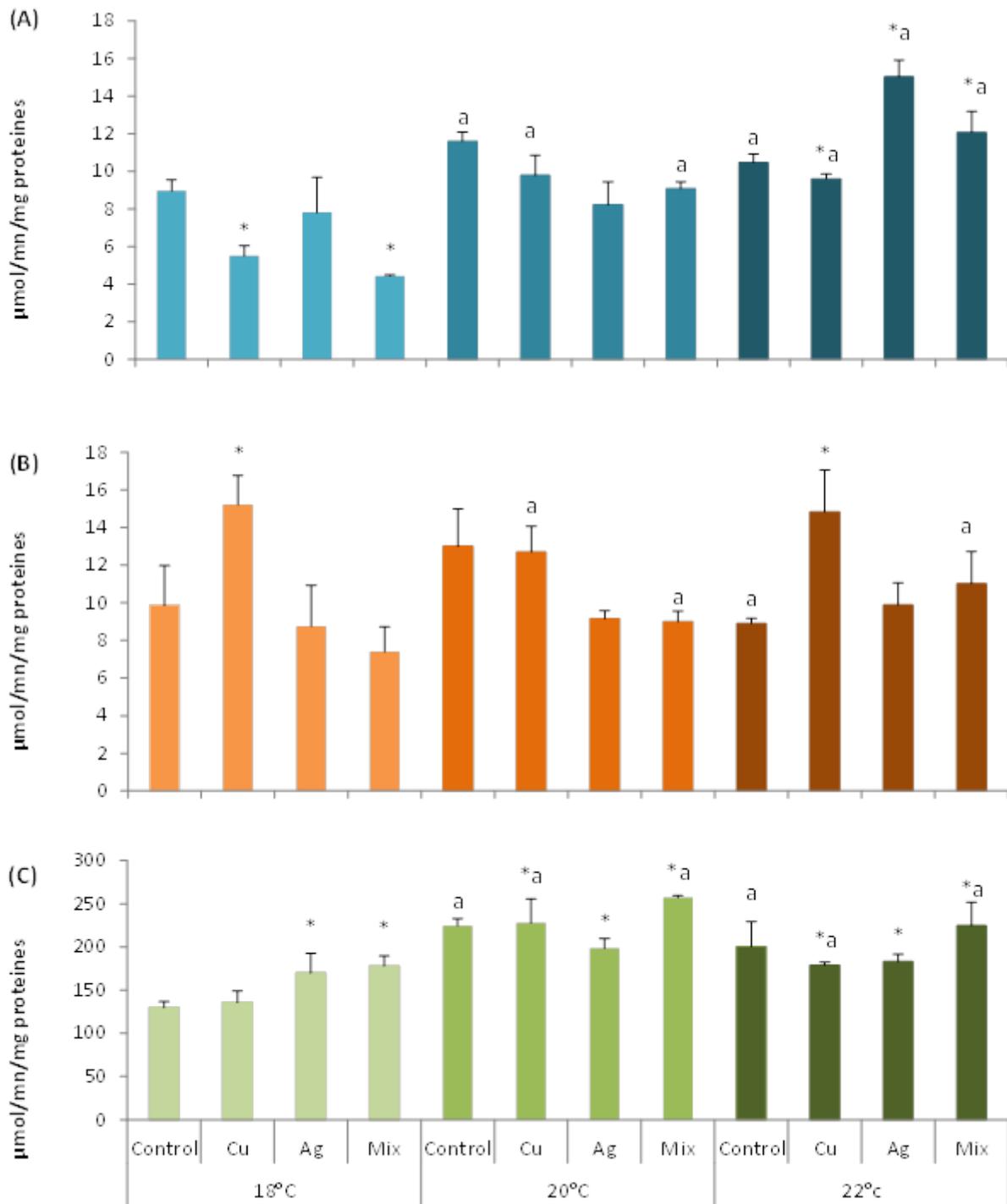


FIGURE 5.3.1 – Les activités de la protéine CAT (A), SOD (B) et GST (C) dans les larves D de *Mytilus galloprovincialis* sont exposées pendant 48 h à Cu, Ag et leur mélange avec un gradient de température (18 ° C, 20 ° C et 22 ° C). Les données, exprimées en $\mu\text{mole} / \text{mn} / \text{mg}$ de protéines pour CAT et GST et SOD ($n = 3$), ont été analysées par ANOVA et le test post-hoc de Tukey. * : Différences statistiquement significatives ($p < 0,01$) par rapport au témoin (18 ° C sans apport de métal). a : Différences statistiquement significatives ($p < 0,01$) par rapport aux larves exposées à la même exposition aux métaux à 18 ° C.

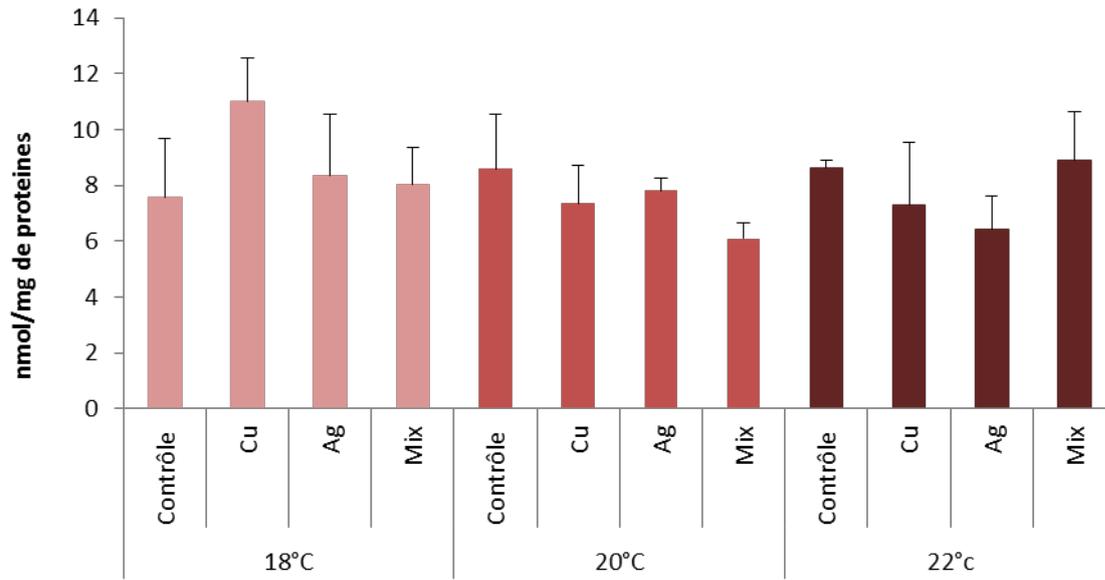


FIGURE 5.3.2 – Accumulation de MDA dans les larves D de *Mytilus galloprovincialis* exposées pendant 48 h au Cu, à l'Ag et leur mélange avec un gradient de températures (18 , 20 et 22 °C). Les valeurs (moyenne +/- ET) sont exprimées en nmole /mn/mg de protéines (n = 3).

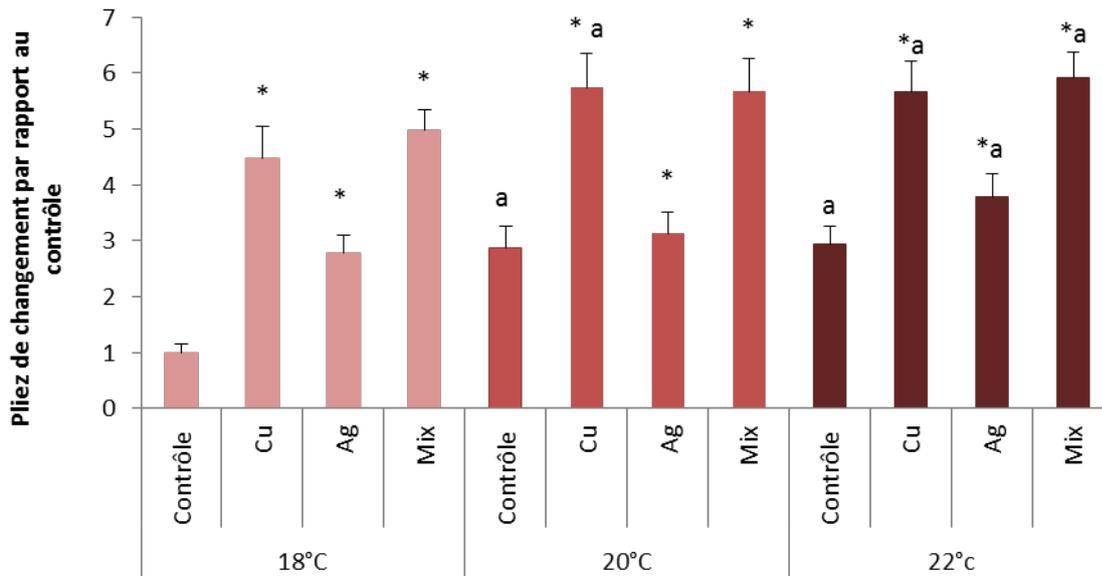


FIGURE 5.3.3 – Variations des niveaux de métallothionéines (moy +/- ET) par rapport au témoin chez les larves-D de *Mytilus galloprovincialis* exposées pendant 48 h au Cu, à l'Ag et leur mélange et à un gradient de température (18, 20 et 22 °C). Les données (n = 4) ont été analysées par une ANOVA et le test post-hoc de Tukey. * : Différences statistiquement significatives (p < 0,05) par rapport à la condition témoin (18 °C sans apport de métal). A : Différences statistiquement significatives (p < 0,01) par rapport aux larves exposées à la même concentration de métaux mais à 18 °C.

5.3.7 Analyse de corrélation entre les variables étudiées

Les corrélations entre les variables chimiques, biochimiques et transcriptomiques étudiées ont été évaluées par le test de corrélation de Pearson et les résultats sont présentés dans le tableau 5.5. Nos résultats montrent que la bioaccumulation du Cu est significativement corrélée avec l'expression génique de mt10 ($r = 0,7$). L'activité catalase est négativement corrélée avec l'expression génique de cat, sod, gst, hsp70, hsp90 et ribol12. En outre, l'activité GST est positivement corrélée avec fk506 ($r = 0,65$). Les métallothionéine sont positivement corrélées avec l'expression génique de mt10 ($r = 0,83$), mt20 ($r = 0,62$), ribo27 ($r = 0,66$) et cathepsine ($r = 0,61$). Les expressions des gènes cat, sod et gst sont fortement corrélées entre elles ainsi que celles des gènes hsp70, hsp90 et ribol12. L'expression génique de mt10 est positivement corrélée avec hsp70 ($r = 0,67$) et hsp90 ($r = 0,66$) alors que l'expression génique de mt20 est fortement corrélée avec hsp27 ($r = 0,79$). L'expression génique de hsp27 est négativement corrélée avec hsp90 ($r = -0,61$) mais elle est positivement corrélée avec calreticulin (calr) et fk506. L'expression génique de hsp70 est fortement corrélée avec hsp90 ($r = 0,95$) et ribol12 ($r = 0,67$). Les expressions géniques de calr et fk506 sont fortement corrélées ($r = 0,94$). De même pour ribol12 et ribos27 ($r = 0,93$), ribol12 et la trypsine ($r = 0,6$), ribos27 et la trypsine ($r = 0,66$) et cathepsine et la trypsine ($r = 0,89$).

TABLE 5.5 – Coefficients de corrélation de Pearson entre les variables cliniques, biochimique et transcriptomiques étudiées. Les chiffres en rouges représentent des corrélations significatives, biochimique et transcriptomiques $p < 0,05$.

Variable	Bioacc-Cu	Bioacc-Ag	Catalase	SOD	GST	TBARS	MT	gene-cat	gene-sod	gene-gst	mt10	mt20	hsp27
Bioacc-Cu	1,00												
Bioacc-Ag	0,20	1,00											
Catalase	0,03	-0,15	1,00										
SOD	0,22	-0,52	0,07	1,00									
GST	0,25	0,29	0,39	-0,13	1,00								
TBARS	-0,39	-0,33	-0,41	0,40	-0,42	1,00							
MT	0,54	0,06	-0,03	0,29	0,51	-0,10	1,00						
gene-cat	0,42	0,10	-0,70	0,00	-0,06	0,32	0,19	1,00					
gene-sod	0,46	0,26	-0,68	-0,06	-0,04	0,26	0,14	0,98	1,00				
gene-gst	0,33	0,33	-0,78	-0,25	-0,07	0,19	0,17	0,92	0,91	1,00			
mt10	0,70	-0,02	-0,37	0,31	-0,11	0,06	0,49	0,64	0,61	0,62	1,00		
mt20	0,41	0,09	0,36	0,19	0,55	-0,39	0,83	-0,28	-0,29	-0,28	0,09	1,00	
hsp27	0,31	0,09	0,51	0,18	0,55	-0,43	0,62	-0,51	-0,49	-0,48	0,07	0,79	1,00
hsp70	0,39	0,24	-0,67	-0,08	-0,11	0,28	0,08	0,94	0,95	0,95	0,67	-0,38	-0,53
hsp90	0,25	0,08	-0,72	0,07	-0,29	0,50	0,04	0,93	0,91	0,89	0,66	-0,45	-0,61
calr	0,31	0,34	0,55	0,04	0,47	-0,47	0,35	-0,45	-0,38	-0,43	0,01	0,50	0,82
fk506	0,40	0,35	0,43	0,08	0,65	-0,48	0,48	-0,31	-0,24	-0,31	0,05	0,55	0,85
ribol12	0,22	0,36	-0,73	-0,10	-0,02	0,20	0,47	0,68	0,65	0,80	0,49	0,14	-0,26
ribos27	0,28	0,35	-0,55	-0,04	0,15	0,08	0,66	0,52	0,48	0,63	0,42	0,43	-0,03
cathepsine	-0,07	0,24	0,04	-0,38	0,51	-0,02	0,61	-0,03	-0,06	0,11	-0,01	0,54	0,46
trypsiine	-0,11	0,24	-0,24	-0,42	0,37	0,01	0,55	0,22	0,16	0,38	0,15	0,37	0,18

Variable	hsp70	hsp90	calr	fk506	ribol12	ribos27	cathepsine	trypsiine
Bioacc-Cu								
Bioacc-Ag								
Catalase								
SOD								
GST								
TBARS								
MT								
gene-cat								
gene-sod								
gene-gst								
mt10								
mt20								
hsp27								
hsp70	1,00							
hsp90	0,95	1,00						
calr	-0,46	-0,54	1,00					
fk506	-0,34	-0,47	0,94	1,00				
ribol12	0,67	0,67	-0,37	-0,27	1,00			
ribos27	0,48	0,46	-0,23	-0,12	0,95	1,00		
cathepsine	-0,08	-0,12	0,29	0,32	0,33	0,46	1,00	
trypsiine	0,17	0,16	0,04	0,07	0,60	0,66	0,89	1,00

5.4 Discussion :

Des études ont été réalisées pour évaluer les effets de la pollution des métaux ainsi que le stress thermique sur la réponse de la moule adulte aux niveaux physiologique, transcriptomique, protéomique et métabolique (Gracey et al., 2008; Tomanek, 2010; Kamel et al., 2012). Cependant, seules quelques études ont été menées pour l'évaluation de la réponse des stades de vie précoces de *Mytilus spp* à ces facteurs de stress environnementaux malgré leur plus grande vulnérabilité par rapport aux adultes. De plus, à notre connaissance, aucune étude n'a concerné les effets du stress thermique combiné à l'exposition aux métaux (cuivre et argent) sur le niveau de stress oxydatif des premiers stades de vie des moules et la dérégulation transcriptionnelle des gènes pouvant se produire dans une telle situation. Pour cela, nous avons mesuré un ensemble d'activités enzymatiques antioxydantes, l'accumulation des métallothionéines et le niveau de transcription de 11 gènes d'intérêt dans les premiers stades de la vie des moules exposées à une concentration sub létale de Cu et d'Ag avec un stress thermique modéré (18, 20 et 22 °C).

Nos résultats ont clairement montré différents degrés d'accumulation de Cu et d'Ag dans les tissus des premiers stades de vie des moules en fonction des conditions d'exposition. Nos résultats indiquent une augmentation des niveaux de Cu et d'Ag ainsi que le gradient de température dans les larves exposées aux composés individuels. Plusieurs études suggèrent que l'accumulation de métal dans les mollusques est dose et temps dépendant (Negri et al., 2013; Attig et al., 2014b). Nos données démontrent que la charge en métaux a diminué de façon significative chez les larves exposées au mélange de contaminants par rapport au métal seul. Cette réduction pourrait être considérée comme une stratégie visant à réduire l'effet négatif de l'accumulation de métal à des températures élevées ou simplement un effet négatif des facteurs de stress environnementaux sur le taux de filtration des larves de moules, comme cela a été démontré chez les adultes exposés au nickel et aux températures élevées (Banni et al., 2014a).

L'exposition au Cu, à l'Ag et au stress thermique a affecté les activités de la CAT, de la SOD et de la GST. Globalement, l'augmentation des activités enzymatiques anti-oxydantes a été enregistrée lors de l'élévation de température. Cependant, aucun effet n'a été enregistré au niveau de la lipoperoxydation comme l'indique le niveau de MDA qui n'est pas significativement différent d'une condition à l'autre. Il est intéressant de noter que l'analyse de l'expression des gènes du système anti-oxydant (cat, sod et gst) chez les larves exposées aux métaux étudiés et/ou au stress thermique a montré une tendance à la surexpression de ces gènes. De plus, bien qu'une diminution significative de l'activité CAT ait été enregistrée chez des larves exposées au Cu seul ou en combinaison avec l'Ag à 18 °C, une augmentation significative a été observée pour les activités SOD et GST dans les

mêmes conditions.

Il est bien connu que le stress thermique peut provoquer un désordre physiologique chez les animaux, ce qui affecte directement le métabolisme, entraînant l'accumulation des EROs (Abele et al., 2002; Rajagopal et al., 2005; Verlecar et al., 2007). Le cuivre et le stress thermique sont des inducteurs puissants du stress oxydatif (Gomes et al., 2011a; Pytharopoulou et al., 2011a; Negri et al., 2013). Cependant, à l'inverse des adultes de *Mytilus spp* exposés au Cu, ce même métal exerce un effet négatif sur l'activité catalase à 18 °C. Ceci peut suggérer que le Cu est très toxique pour les premiers stades de la vie des moules, beaucoup plus que pour les adultes. En effet, la sensibilité des stades précoces de la vie des invertébrés marins aux facteurs de stress environnementaux tels que les métaux lourds a déjà été documenté (Ringwood, 1991; His et al., 1999a). Le rétablissement de l'activité catalase à des températures plus élevées en présence de Cu pourrait être expliqué par une réponse spécifique au stress thermique telle que suggérée par Gomes et al. (2011a) et Pytharopoulou et al. (2011a).

En plus de la production directe des radicaux libres, l'Ag est soupçonné d'entraîner une déplétion du système enzymatique antioxydant (Skalska & Strużyńska, 2015). En effet, il a été signalé que l'Ag produisait des niveaux faibles mais mesurables de radicaux libres dans les macrophages alvéolaires (Carlson et al., 2008). Gomes et al. (2014) ont rapporté une augmentation significative des activités enzymatiques anti-oxydantes dans les moules exposées à des concentrations sublétales d'Ag. De plus il a été documenté que les ions argent induisent une réponse inflammatoire dans le foie des médaka japonais exposés, avec pour corollaire une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le stress oxydatif (Chae et al., 2009). Comme d'autres organismes, les moules peuvent contrôler les niveaux croissants des EROs dans leurs tissus en activant leur système de défense antioxydant cellulaire, composé à la fois de composants enzymatiques et non enzymatiques. La voie enzymatique consiste à produire des enzymes protectrices des EROs, telles que la SOD qui transforme les anions superoxyde en H_2O_2 puis la catalase qui dégrade l' H_2O_2 en H_2O et O_2 (Chae et al., 2009). Dans notre étude, les gènes codant pour les enzymes antioxydantes présentaient un profil d'expression atypique en fonction du métal ainsi que de la température d'exposition. Cela peut suggérer une régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes dans les tissus des premiers stades de vie des moules exposées à des facteurs de stress environnementaux.

Dans la présente étude, nous avons également observé une augmentation significative de l'accumulation de Mts dans les larves-D de moules exposées au Cu et à l'Ag ainsi que dans des larves exposées uniquement à un stress thermique. Bien qu'il soit bien connu que le Cu est un inducteur puissant des métallothionéines, la corrélation entre l'exposition à l'Ag et l'induction de Mts est encore controversée.

Néanmoins, [Gomes et al. \(2014\)](#) ont récemment signalé une augmentation substantielle de la teneur en métalloprotéines dans les branchies des moules adultes exposées aux ions Ag. De plus, on a signalé que les ions d'argent induisent une réponse inflammatoire dans le foie de la médaka japonaise exposée, ce qui augmente l'expression des gènes impliqués dans le stress oxydatif ([Chae et al., 2009](#)). L'induction significative des métallothionéines au niveau protéique et au niveau ARNm dans les larves exposées aux métaux et/ou au stress thermique pourrait être attribuée à la présence de métaux et des EROs dans les cellules ([Viarengo et al., 1999](#); [Dondero et al., 2005](#)). En fait, le facteur de transcription métallique 1 (MTF-1) fonctionnant comme un capteur de Zn intracellulaire, est responsable de l'expression basale et médiée par Zn/Cu de MT-1 chez les mammifères ([Sadhu & Gedamu, 1988](#)). Ce facteur de transcription peut fonctionner chez les moules en tant que détecteur de l'état redox de la cellule, déclenchant une réponse rapide et spécifique lors de l'apport excessif de métaux lourds ou d'oxydants hautement électrophiles ([Dondero et al., 2005](#); [Banni et al., 2007](#)).

Nos travaux antérieurs (chapitre 4) ont fourni les premières preuves de la sensibilité élevée des stades précoces de la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis* à l'accroissement de la température de l'eau et à la pollution de l'argent. Nos résultats suggèrent que la température optimale pour le développement des larves de moules est de 18 °C (taux de malformations minimal de $12,65 \pm 1,6$ %). Des effets embryotoxiques ont été observés après une exposition à une faible augmentation de température ($67,06 \pm 1,83$ % de malformations à 22 °C) pour atteindre 100 % de malformations à 24 °C. On a montré que le cuivre et l'argent étaient embryotoxiques pour des faibles concentrations de ces deux métaux. Combiner un stress thermique et un stress chimique écologiquement réalistes pourrait fortement affecter les limites de tolérance et nuire au développement et à la reproduction de *M. galloprovincialis*. Les résultats de nos travaux antérieurs, combinés à cette étude, démontrent la toxicité de l'argent et du cuivre pour le développement embryolaire des moules et mettent en évidence une probable diminution des capacités de reproduction de *M. galloprovincialis* dans les années futures avec l'accroissement des concentrations en polluants et l'augmentation de la température de l'eau en raison du réchauffement climatique.

Une hypothèse pour expliquer l'apparition d'altérations du développement pourrait être l'impact des facteurs de stress étudiés sur l'organisation du cytosquelette et/ou sur la formation de la coquille connue pour être directement liée au métabolisme de la chitine ([Lockwood et al., 2010](#)). En outre, [Negri et al. \(2013\)](#) ont montré que le stress thermique (24 °C) et l'exposition au cuivre dans les moules conduisent à une régulation positive des gènes impliqués dans la protection du cytosquelette. Ils ont également signalé chez les adultes de *Mytilus galloprovincialis* une régulation négative des gènes du métabolisme de la chitine lors d'une exposi-

tion au cuivre et à un stress thermique. Dans les organismes présentant une chitine, les chitinases sont essentielles au maintien des fonctions normales du cycle de vie telles que la morphogenèse (Merzendorfer & Zimoch, 2003), la division cellulaire et l'immunité (Kuranda & Robbins, 1991). Chez les moules et autres invertébrés marins, les chitinases jouent un rôle majeur dans la digestion et dans le contrôle des processus de croissance et de remodelage de l'individu.

5.5 Conclusion

Le réchauffement climatique est une menace émergente pour les écosystèmes du monde entier. Ce travail constitue une première étude pour mieux comprendre comment une augmentation de la température peut avoir des effets négatifs sur les premiers stades de vie des organismes marins, en particulier dans les milieux côtiers soumis à des rejets anthropiques. La présente étude a fourni des indices sur la transcription précoce des gènes antioxydants ainsi que des Mts après exposition au Cu, à l'Ag et à stress thermique modéré chez les premiers stades de vie des moules. De plus, le maintien de niveaux faibles de MDA chez les larves exposées prouve l'efficacité du système antioxydant pour contrebalancer la production des EROs. D'autres processus biologiques associés comme le dépôt de chitine et l'organisation du cytosquelette ainsi que le repliement des protéines pourraient être affectés par l'exposition aux métaux ou à un stress thermique. Des études complémentaires sont nécessaires pour établir une image claire de la réponse cellulaire suite à l'exposition au métal et au stress thermique au début de la vie des moules.

Chapitre 6

**Analyse des effets seuls et combinés
de la température, du cuivre et de
l'argent sur le niveau d'altération de
l'ADN chez les stades
embryo-larvaire de la moule
méditerranéenne *Mytilus
galloprovincialis***

6.1 Introduction

Le milieu marin est soumis à de nombreuses pressions anthropiques, en particulier dans les zones côtières et estuariennes. Les divers produits chimiques, biodisponibles pour les organismes, menacent la biodiversité de l'écosystème marin. Suite à leur pénétration dans l'organisme, les polluants chimiques peuvent exercer différents types de toxicités allant du niveau moléculaire à des niveaux physiologiques, déclenchant des conséquences potentielles à l'échelle individuelle ou communautaire (Matthiessen & Law, 2002; Islam & Tanaka, 2004).

Dans les études écotoxicologiques, les analyses sont généralement concentrées sur quelques effets toxiques et sur un nombre restreint d'individus. La difficulté est de prédire les conséquences à long terme de ces effets toxiques sur la population, la communauté et l'écosystème : tel est le cas pour les dommages à l'ADN, malgré leur implication présumée dans la mutagenèse, la cancérogenèse, le vieillissement et d'autres pathologies.

Les biomarqueurs de génotoxicité sont de plus en plus utilisés en écotoxicologie aquatique, menant à des avancées méthodologiques et une utilisation dans le domaine de l'éco-génotoxicologie (Dixon, 2002). Ils sont principalement utilisés pour l'évaluation des conséquences sur la survie des populations vivant dans des environnements contaminés (Belfiore & Anderson, 2001; Jha, 2004). Diekmann et al. (2004) ont démontré la pertinence de l'étude de la génotoxicité pour les populations d'organismes aquatiques qui peut servir comme base à une évaluation des risques écotoxicologiques des substances génotoxiques dans les eaux de surface.

La diminution de la fécondité et l'augmentation de la mortalité embryonnaire ont été mis en corrélation avec les lésions cytogénétiques chez les invertébrés (Anderson & Wild, 1994). Ces études ont également apporté la preuve que les premiers stades de vie peuvent conférer une vulnérabilité aux substances génotoxiques. En outre, cela a mis en évidence la nécessité des tests de génotoxicité sur les stades de développement embryo-larvaires dans l'évaluation des risques écologiques (Depledge, 1998). Récemment, Lewis & Galloway (2009) ont montré que le succès de fécondation avec des spermatozoïdes dont l'ADN est endommagé n'est pas affecté, mais qu'un pourcentage significatif d'embryons présentait de graves anomalies du développement chez deux espèces d'invertébrés marins.

Dans les études écotoxicologiques, il est important de comprendre comment les différentes réponses toxicologiques sont exprimées et reliées les unes aux autres (Jha, 2004). Dans ce contexte, en fonction des niveaux d'exposition, des cellules cibles et des niveaux d'altération étudiés, il devient de plus en plus clair que les propriétés toxicologiques de toute substance pourraient se manifester de différentes façons.

Cette étude vise premièrement à évaluer la génotoxicité du Cu et d'Ag, puis à

apporter des éléments de réponse à la relation qui peut exister entre la génotoxicité et l'embryotoxicité de certains produits chimiques. Une telle relation a déjà été suggérée par certains auteurs qui proposent l'accumulation de dommages à l'ADN non réparés comme une variable explicative de l'embryotoxicité chimique (Anderson & Wild, 1994). Par son effet direct sur le taux de recrutement, l'embryotoxicité est l'un des paramètres qui régissent la dynamique des populations. Cette relation devait donc permettre d'établir un lien entre les marqueurs précoces de génotoxicité et les effets sur la dynamique des populations.

La moule méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), est le modèle biologique choisi pour cette étude. En raison de ses particularités bio-écologiques (animal filtreur, sessile, ubiquitaire), la moule est un organisme modèle pour la bio-surveillance de l'environnement marin. La connaissance de son cycle de vie et la maîtrise de son élevage et de sa reproduction permettent le développement d'un essai biologique basé sur le pourcentage des larves-D anormales comme une mesure d'embryotoxicité (His et al., 1997). Les altérations de l'ADN par les stress environnementaux sont souvent évalués par le test des comètes (Singh et al., 1988). Le paramètre le plus fréquemment utilisé pour la détermination des dommages à l'ADN total est le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (Ashby et al., 1995). En outre, Le niveau d'expression des gènes codant pour des protéines impliquées soit dans la réparation ou l'altération de l'ADN est un paramètre récent en écotoxicologie et un moyen pour relier exposition et effets des génotoxiques environnementaux.

6.2 Protocole expérimental

Les analyses de la génotoxicité et de l'expression génique nécessitent différentes quantités de matériels biologiques (nombre des larves) et différents stades de développement embryonnaire. Comme le test des comètes nécessite une étape préalable de dissociation cellulaire enzymatique qui ne peut pas se faire sur une larve présentant une coquille, le stade larve trochophore (24 h post fécondation ; avant la formation de la coquille) a été utilisé. Cependant, l'étude de l'expression génique a été réalisée sur des larves-D (48 h post fécondation). Pour cela des expositions indépendantes ont été réalisées.

6.2.1 Conditions d'exposition

L'évaluation de l'effet toxique des deux métaux modèles, cuivre et/ou argent, a été réalisée en utilisant une concentration de cuivre CE20 $\text{Cu} = 9,54 \mu\text{g/L}$; une concentration d'argent CE20 $\text{Ag} = 2,55 \mu\text{g/L}$ et le mélange des CE10 des deux composés : CE10 $\text{Cu} = 6,67 \mu\text{g/L} + \text{CE10 Ag} = 1,47 \mu\text{g/L}$. L'effet de l'augmen-

tation de température, chez les premiers stades de développement de la moule, a été évalué en réalisant des expositions à trois températures différentes : 18 (température optimale de développement) ; 20 et 22 °C. Le choix de ces conditions a été expliqué dans la partie Bases méthodologiques.

Le niveau d'expression génique a été étudié chez des larves-D (48 h d'exposition) de 4 couples (4 réplicats biologiques). Environ 40 000 larves ont été utilisées par réplicat issues d'un seul couple de géniteurs et 4 expositions indépendantes ont été effectuées en utilisant les embryons d'un seul couple à chaque fois (tableau 6.1).

Pour le test des comètes, environ 100 000 embryons de moule méditerranéenne *M. galloprovincialis* juste fécondés par réplicat, issus de la fécondation d'un couple de géniteurs, ont été exposés aux différentes conditions de contamination et de température jusqu'au stade trochophore (24 h d'exposition). Trois expositions indépendantes ont été effectuées en utilisant les embryons d'un seul couple à chaque fois (tableau 6.1).

Afin de vérifier le taux de malformations larvaires et valider l'utilisation des larves dans les analyses moléculaires, 4 prélèvements de 2 mL ont été effectués à partir de chaque condition et les larves prélevées ont été mises dans des micro-plaques de 24 puits. Comme le test des comètes a été fait à 24 h d'exposition, les micro-plaques contenant les larves prélevées ont été ré-incubées dans les mêmes conditions de température pour continuer leur développement jusqu'au stade larve-D. Ensuite, les larves ont été formolées et conservées à 4 °C pour permettre l'analyse du taux de malformations larvaires.

TABLE 6.1 – Conditions d'exposition et paramètres suivis pour les analyses phénotypique, génotoxique et transcriptomique

Analyses	Nombre de conditions	Nombre de reliquats	Nombre d'embryons/réplicat	Temps d'exposition (h)	Paramètres suivis
RT-PCR	12	4	40 000	48 post fécondation	Expression génique
Test des comètes	12	3	100 000	24 post fécondation	Dommage ADN : % ADN dans la queue
Test embryon-larvaire	12	3	100	48 post fécondation	Malformations larvaires

Les procédures de prélèvement et de conservation des larves destinées aux analyses transcriptomiques ont été effectuées comme décrit dans la partie Bases Mé-

thodologiques. Le test des comètes a été réalisé sur des larves trochophore immédiatement après prélèvement (ne peuvent pas être conservées) comme décrit dans la partie Bases Méthodologiques.

Suite à l'exposition aux métaux modèles étudiés (Cu, Ag) et à la température, l'embryotoxicité a été évaluée en calculant le pourcentage de Larves-D malformées. La génotoxicité a été mesurée en parallèle par les cassures de brins d'ADN (test des comètes) et les lésions oxydatives (test des comètes modifié avec une enzyme de réparation). Les corrélations entre génotoxicité et embryotoxicité ont ensuite été recherchées.

6.2.2 Choix des gènes étudiés

Au vu des effets toxiques connus du cuivre, de l'argent et de la température chez les stades embryo-larvaires des moules méditerranéennes *M. galloprovincialis* (voir chapitre 4), 18 gènes cibles ont été choisis, en fonction des séquences codantes disponibles sur les bases de données, pour évaluer leurs effets au niveau des processus cellulaires dont 4 gènes sont impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN et d'apoptose :

- **p53** : une protéine suppresseur de tumeur qui joue un rôle majeur dans la prévention du développement tumoral. Il s'agit principalement d'un facteur de transcription qui active plusieurs gènes impliqués dans le contrôle de cycle cellulaire, l'apoptose, la réponse des dommages à l'ADN, etc. en réponse à différents types de stress (génotoxiques ou cytotoxiques).
- **caspase 3** : une protéase impliquée dans le processus d'apoptose cellulaire.
- **dna-ligase** : une enzyme impliquée dans la réparation des irrégularités ou des cassures de l'ADN.
- **topoisomérase** : impliquée dans le maintien de la stabilité génomique (enroulement et déroulement de l'ADN).

6.3 Traitement statistique

Les résultats ont d'abord été testés pour la normalité (test de Shapiro-Wilk sur les résidus avec un risque de 1 %) et de l'homogénéité de la variance (test de Levene, risque de 5 %). Si les conditions d'utilisation sont respectées, des différences significatives entre les traitements ont été testés avec une ANOVA suivi du test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$). Dans le cas contraire, une analyse non-paramétrique par le test de Kruskal-Wallis a été utilisé ($p < 0,05$). L'existence et la force des relations entre les paramètres ont été déterminées par une analyse de corrélation de Pearson. L'ensemble des données ont été traitées statistiquement à l'aide du logiciel R (<http://cran.r-project.org/>).

6.4 Résultats

6.4.1 Embryotoxicité

L'embryotoxicité du cuivre, de l'argent, en mélange ou non et à plusieurs températures pour les larves-D de moule *M. galloprovincialis* a déjà été étudié et mis en évidence précédemment. Des résultats similaires ont été obtenus dans cette étude et sont présentés dans les figures 6.4.1 ; 6.4.2 et 6.4.3.

On a constaté une augmentation significative de pourcentage de larves-D malformées ($p < 0,05$) avec l'augmentation de température d'exposition : 13 ; 19,1 et 46,6 % à 18, 20 et 22 °C respectivement. Aucune différence significative n'a été observé entre la température 18 et 20 °C quelle que soit la condition d'exposition (avec ou sans métal). L'argent s'est avéré plus toxique que le cuivre pour les larves de moules avec 36,33 et 30 % respectivement de larves malformées (mais la différence est non significative). La toxicité des métaux augmente significativement ($p < 0,05$) avec l'augmentation de température.

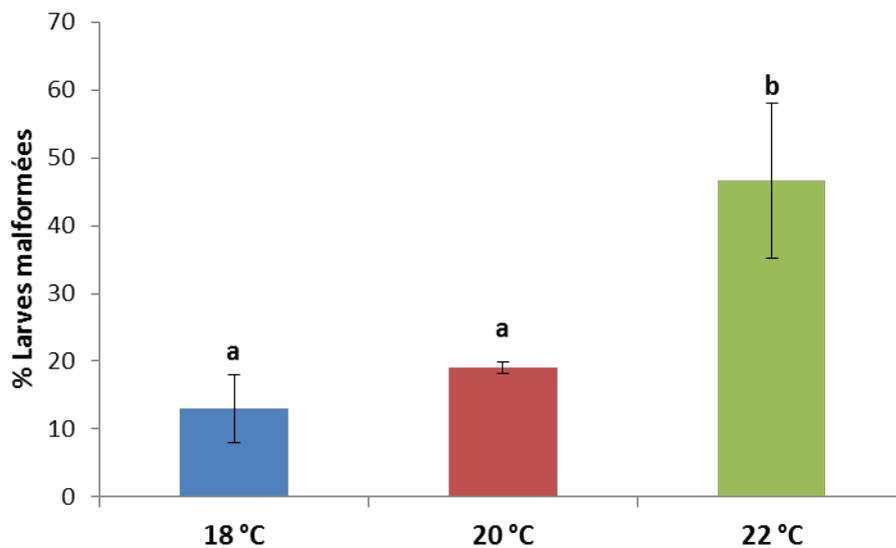


FIGURE 6.4.1 – Pourcentages de malformation de larve D de moule *M. galloprovincialis* (moyenne \pm écart-type, N=3) suite à l'exposition à différentes températures. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre températures appliquées ($p < 0.05$, test post hoc de tukey).

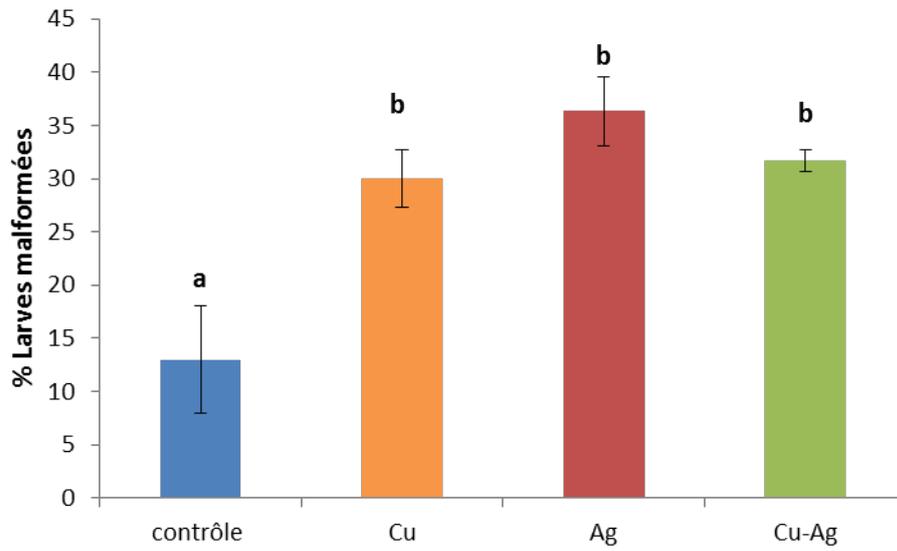


FIGURE 6.4.2 – Pourcentages de malformation de larve D de moule *M. galloprovincialis* (moyenne \pm écart-type, N=3) suite à l'exposition au cuivre et/ou à l'argent (B) à 18 °C. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les différentes conditions ($p < 0.05$, test post hoc de tukey).

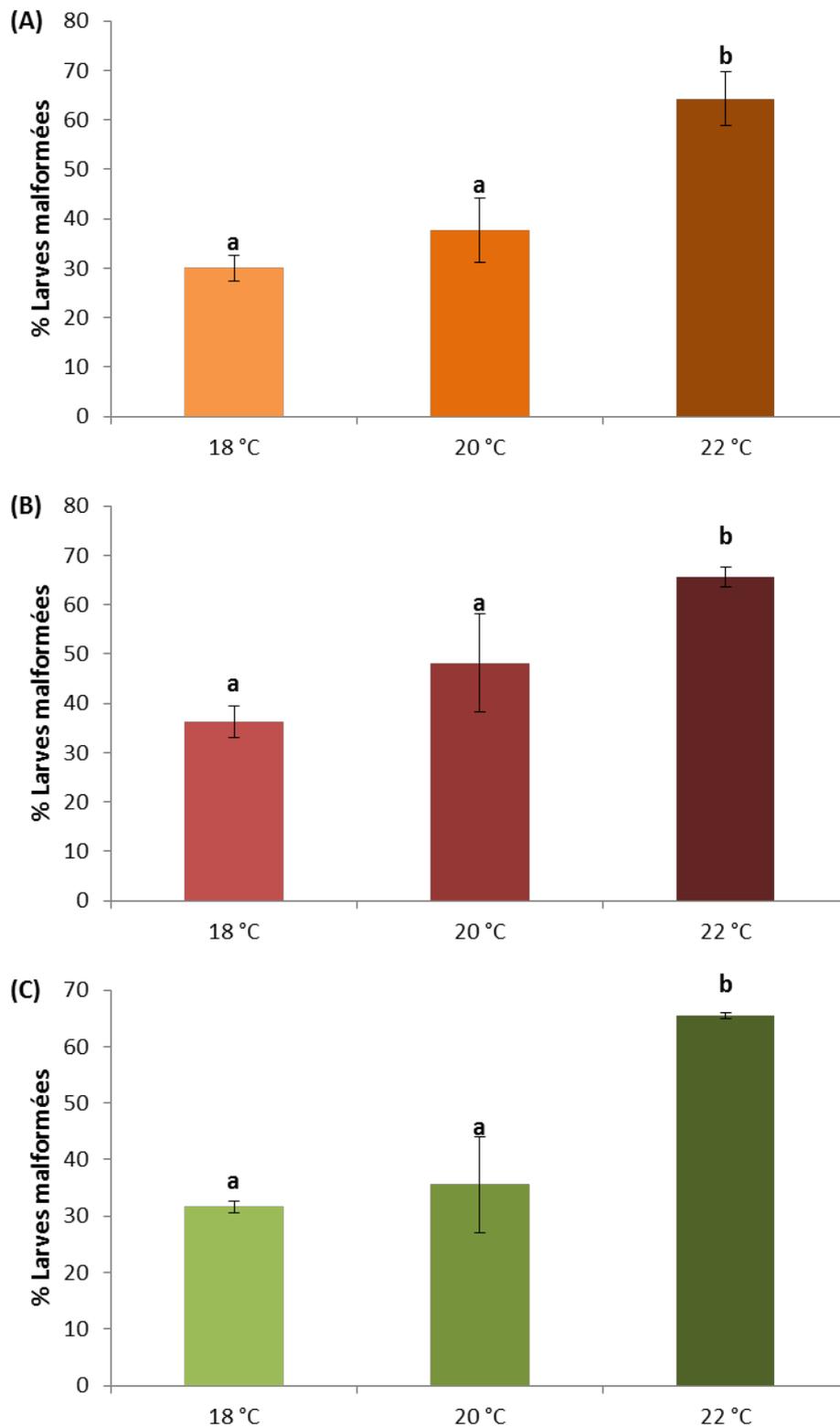


FIGURE 6.4.3 – Pourcentages de malformation de larve D de moule *M. galloprovincialis* (moyenne \pm écart-type, N=3) suite à l'exposition au cuivre (A), à l'argent (B) ou au mélange des deux métaux (C) et à différentes températures. Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les températures appliquées pour ($p < 0.05$, test post hoc de tukey) pour un contaminant donné.

6.4.2 Dommages à l'ADN : Génotoxicité

Les effets génotoxiques du cuivre, de l'argent, du mélange des deux métaux et de la température ont été évalués à l'aide du test des comètes chez les larves-D de moules *M. galloprovincialis*. Le test classique de comète a été réalisé pour détecter les cassures simples et doubles brins et le test modifié avec la Formamidopyrimidine DNA glycosylase (fpg) a été utilisé pour détecter l'ensemble des dommages à l'ADN (cassures et dommages oxydatifs). Les cassures des brins de l'ADN et les dommages oxydatifs ont été retenus comme marqueurs de l'état d'endommagement de l'ADN des cellules. Le pourcentage des dommages oxydatifs a été calculé en retirant le pourcentage des cassures d'ADN de l'ensemble des dommages à l'ADN.

Les effets génotoxiques liés à l'accroissement de la température chez les larves-D de la moule sont présentés dans la figure 6.4.4. Le niveau basal de dommages à l'ADN dans les groupes témoins à 18 °C varie de 6 à 8 % d'ADN dans la queue avec une moyenne de 7,3 %. Aucune induction significative des cassures de l'ADN n'a été observée à 20 °C sans fpg. Cependant, à 22 °C, le pourcentage d'ADN endommagé a significativement augmenté ($p < 0.05$) pour atteindre 14,8 %. Toutefois, les altérations oxydatives de l'ADN ont été significativement induites ($p < 0.05$) dès la température de 20 °C avec un pourcentage de 35,6 % par rapport à 24,6 % à 18 °C.

Les effets génotoxiques du cuivre et/ou de l'argent à 18 °C sont présentés dans la figure 6.4.5. Aucune différence significative des cassures des brins d'ADN n'a été marquée chez les larves exposées à une concentration d'argent ou de cuivre par rapport à la condition contrôle. Cependant, l'exposition des larves au mélange des deux métaux (Cu-Ag) induit significativement les cassures des brins d'ADN par rapport au témoin 18 °C avec un pourcentage 13,6 %. Les altérations oxydatives de l'ADN ont été significativement induites chez les larves exposées au cuivre, argent et au mélange par rapport à la condition contrôle 18 °C.

L'effet combiné de la température et des métaux est présenté dans la figure 6.4.6. L'augmentation de température accroît significativement ($p < 0.05$) le pourcentage des cassures des brins d'ADN dès 20 °C avec les différentes conditions d'exposition. Les altérations oxydatives ont été induites dès 20 °C avec le cuivre et l'argent avec des valeurs respectivement de 36,8 et 44,7 %, mais la différence n'est pas significative par rapport au contrôle. Toutefois, une température 22 °C augmente significativement les altérations oxydatives avec le cuivre et l'argent. Chez les larves exposées au mélange des deux métaux, l'augmentation de température induit un accroissement des altérations oxydatives de l'ADN, cependant l'analyse statistique ne permet pas de discriminer l'effet de la température.

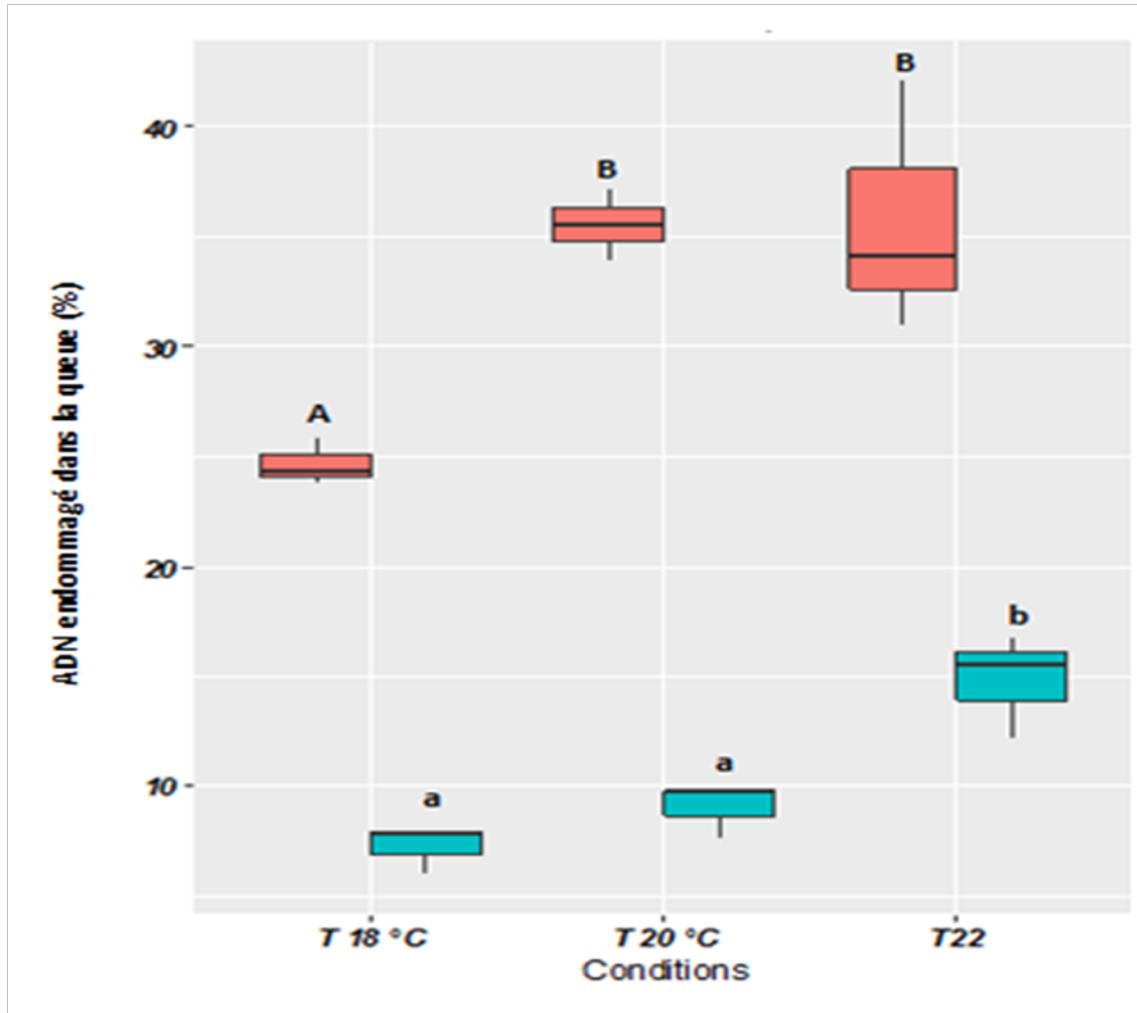


FIGURE 6.4.4 – Évaluation par le test des comètes, sans fpg (bleu) et avec fpg (rouge), de l'effet de la température sur le niveau d'altération de l'ADN chez des larves trochophores de moules après exposition à 18, 20 et 22 °C durant leur développement embryonnaire.

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition \pm écart-type (N = 3). Le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète a été mesuré sur 200 cellules par échantillon. Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ($p < 0,05$ selon le test post-hoc de Tukey).

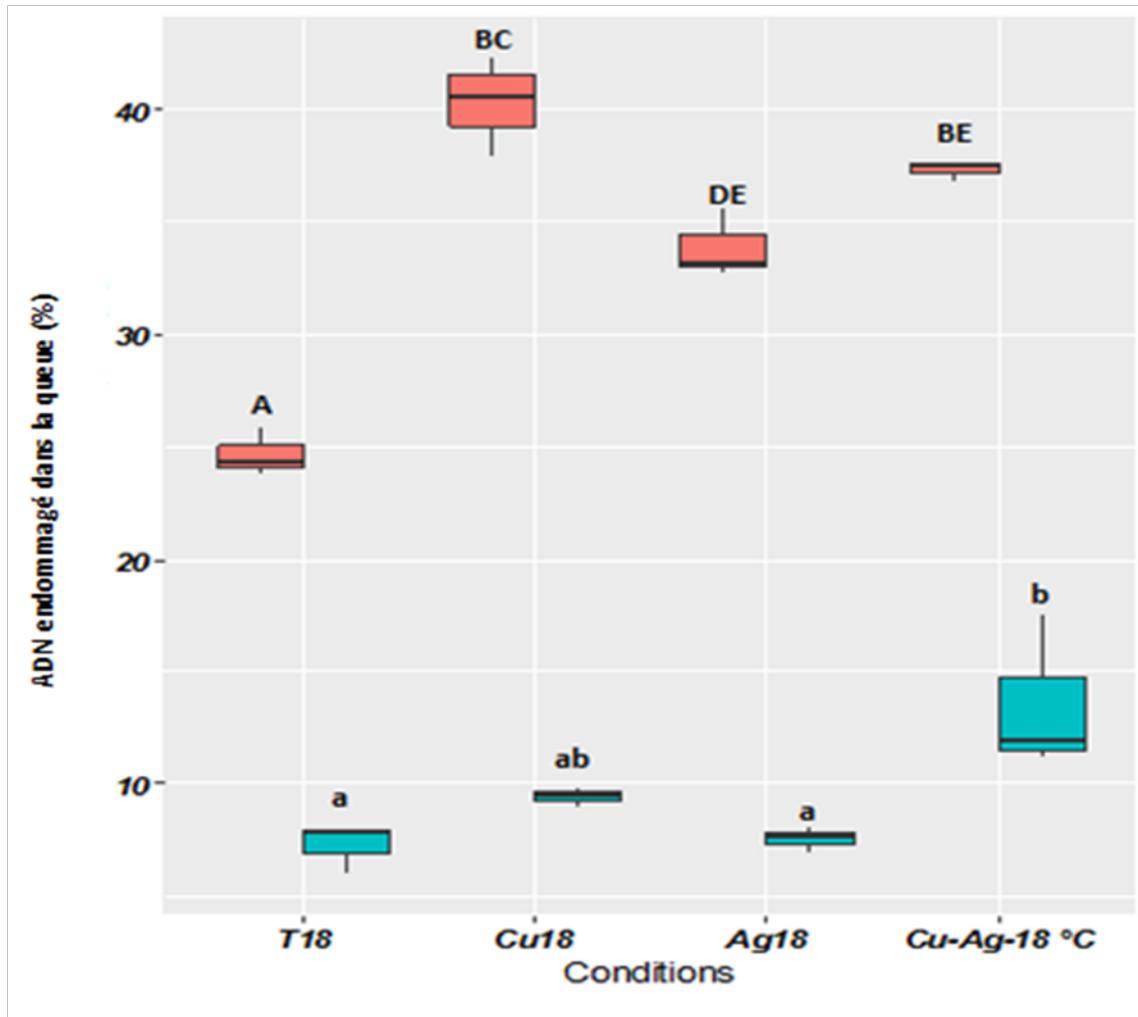


FIGURE 6.4.5 – Évaluation par test des comètes, sans fpg (bleu) et avec fpg (rouge), l'effet de Cu et/ou Ag sur le niveau d'altération de l'ADN chez des larves trochophores de moules après exposition à 18 °C durant leur développement embryonnaire.

Les données sont présentées sous forme de moyenne par condition \pm écart-type ($N = 3$). Le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète a été mesuré sur 200 cellules par échantillon. Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ($p < 0,05$ selon le test post-hoc de Tukey).

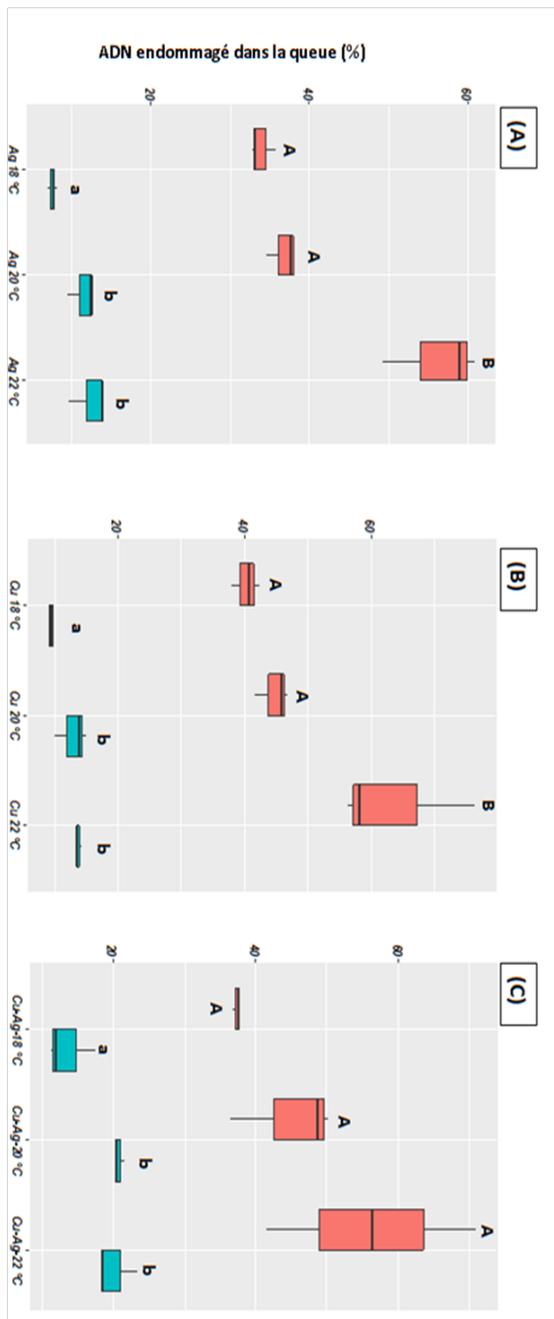


FIGURE 6.4.6 – Évaluation par le test des comètes, sans fpg (bleu) et avec fpg (rouge), de l'effet combiné de la température et de Cu et/ou Ag sur les dommages de l'ADN chez des larves trochophores de moules. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart-type ($N = 3$). Le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète a été mesuré sur 200 cellules par échantillon. Les résultats de l'analyse statistique sont indiqués par des lettres : des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes concernés ($p < 0,05$ selon le test post-hoc de Tukey).

Une étude statistique des relations entre les effets embryotoxiques et génotoxiques de tous les stress appliqués chez les larves de moules a été effectuée et les résultats sont présentés dans la figure 6.4.7. Les valeurs des dommages oxydatifs sont représentées par la différence des résultats obtenus par le test des comètes avec et sans enzyme de réparation. Aucune corrélation n'a été notée entre l'embryotoxicité et les cassures des brins d'ADN ($r^2 = 0.2287$, $r = 0.4782$ et $p = 0.1158$). Cependant une corrélation positive a été mise en évidence entre l'embryotoxicité et les dommages oxydatifs à l'ADN ($r^2 = 0.5792$, $r = 0.761$ et $p = 0.004041$). De plus, une forte corrélation entre l'embryotoxicité et l'ensemble des dommages de l'ADN est également observée ($r^2 = 0.7182$, $r = 0.8474$ et $p = 0.0005001$).

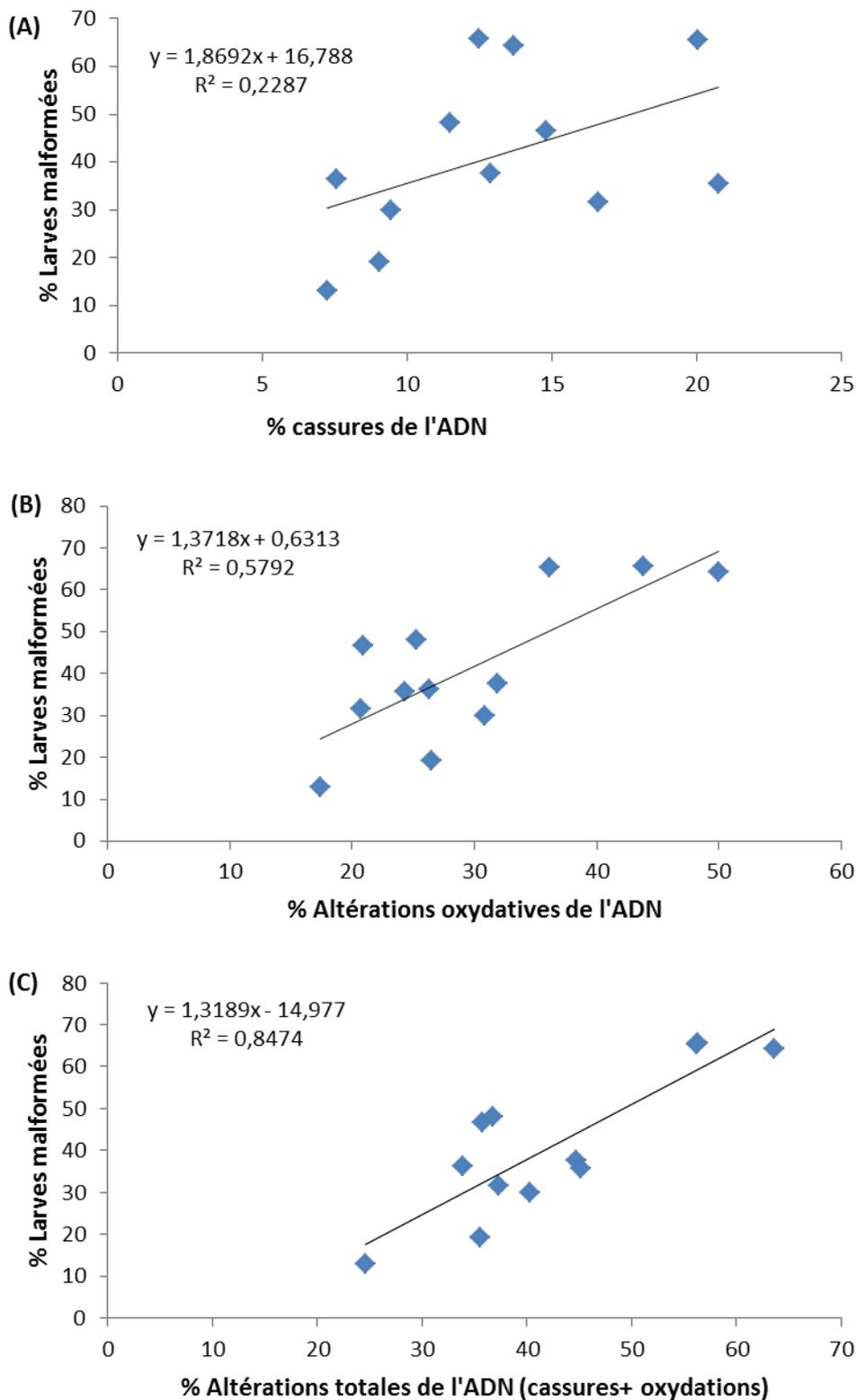


FIGURE 6.4.7 – Relation entre le pourcentage de larves-D malformées et le pourcentage des cassures des brins d'ADN (A), les altérations oxydatives de l'ADN (B) et l'ensemble de ces deux dommages (C) suite à l'exposition au Cu et/ou à l'Ag et à différentes températures.

6.4.3 Altération du profil d'expression génique

Le niveau de transcription relatif des 4 gènes d'intérêt a été déterminé en utilisant la β -actine, le 18S et le ribol-27 comme gènes de référence. Ces gènes de référence présentaient des niveaux d'expression stables dans le temps et selon le traitement avec des pourcentages d'efficacité égaux à 97,7 ; 91,5 et 95,8 % respectivement. L'expression des 4 gènes cibles impliqués dans les mécanismes de réparation d'ADN et de l'apoptose a été analysé par RT-PCR chez les larves-D de moules *M. galloprovincialis* après exposition à une concentration de cuivre, de l'argent et du mélange Cu-Ag à un gradient croissant de température (18, 20 et 22 °C). Les facteurs d'induction (FI) ou de répression (FR) pour chaque gène dans les différentes conditions d'exposition ont été déterminés par rapport à la condition contrôle à 18 °C. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le tableau 6.2.

Chez les larves-D de la moule méditerranéenne, l'exposition à une température de 20 °C n'affecte pas le profil d'expression génique des différents gènes étudiés. Cependant, une température de 22 °C induit significativement l'expression des gènes p53, dna-ligase et la topoisomérase. Le pourcentage d'efficacité de PCR est de 105,8 % pour p53 ; 101,4 % pour caspase-3 ; 104,8 % pour l'ADN-ligase et 97,4 pour la topoisomérase.

Aucun changement dans le profil d'expression génique des 4 gènes étudiés n'a été détecté lors d'une exposition des larves à l'argent à 18 °C. Par ailleurs, l'expression des deux gènes dna-ligase et topoisomérase sont significativement surexprimés suite à une exposition au cuivre ou au mélange Cu-Ag (Mix) à 18 °C.

La co-exposition des larves-D de moule à une contamination métallique et à un accroissement de température montre un changement significatif dans le profil d'expression génique des 4 gènes étudiés par rapport à la température 18 °C. Une température de 20 °C chez les larves exposées à une dose de Cu ou d'Ag induit une surexpression significative des gènes p53 (FI Cu=2,33 ; FI Ag=2,41), dna-ligase (FI Cu=3,72 ; FI Ag=3,19) et topoisomérase (FI Cu=3,28 ; FI Ag=2,92). Lors de l'exposition au mélange, la température 20 °C induit également la surexpression du p53 (FI =2,35) en plus du gène caspase-3 (impliqué dans le processus de l'apoptose) avec un FI= 2,82.

Le gène p53 demeure significativement surexprimé dans les trois conditions de contamination métallique (Cu ; Ag et Mix) à 22 °C avec un FI plus important en condition Mix (4,77). On remarque une surexpression significative de la caspase-3 par rapport à la condition contrôle 18 °C chez les larves co-exposées à une température 22 °C et Cu (FI= 2,5), Ag (FI= 3) ou le Mix (FI= 5,7). Cependant, les deux gènes dna-ligase et topoisomérase sont significativement réprimés par rapport à la condition contrôle 18 °C suite à l'exposition au Cu, Ag ou Mix à 22 °C.

TABLE 6.2 – Expression différentielle des gènes d'intérêt, p53 ; caspase-3 ; ADN-ligase et topoisomérase, chez les larves-D de la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis* au cours de l'analyse de l'effet seul ou combiné de la température (18, 20 et 22°C) et Cu et/ou à l'Ag.

Gènes	18 °C			20 °C			22 °C				
	Cu	Ag	Mix	Contrôle	Cu	Ag	Mix	Contrôle	Cu	Ag	Mix
p53	/	/	/	/	2,33*	2,41*	2,35*	1,92*	1,82*	2,85*	4,77*
caspase 3	/	/	/	/	/	/	2,82*	/	2,54*	3,08*	5,69*
dna-ligase	3,45*	/	3,49*	/	3,72*	3,19*	/	4,58*	/	0,48*	0,32*
topoisomérase	2,44*	/	3,71*	/	3,28*	2,92*	/	3,54*	/	0,53*	0,37*

Les résultats sont présentés sous forme des facteurs d'induction (en rouge) ou de répression (en vert) par rapport au contrôle à 18 °C et ont été normalisés par rapport à la β -actine, 18S et ribol-27. Un astérisque (*) indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport à la condition contrôle 18 °C selon Pfaffl et al. (2002), $n=4$. Le symbole signifie l'absence de variation significative de l'expression relative par rapport au contrôle 18 °C.

6.4.4 Étude de corrélation entre les différents paramètres étudiés

L'analyse de corrélation entre les niveaux d'altération d'ADN et l'expression génique des 4 gènes d'intérêt étudiés est présentée dans la figure 6.4.8. Les résultats ont révélé des relations significatives entre les dommages de l'ADN et les deux gènes associées à la mort cellulaire programmée, caspase-3 ($r= 0.73$; $p<0.01$) et p53 ($r= 0.62$; $p= 0.032$). Ces deux gènes sont en forte corrélation avec les deux types d'altération d'ADN mais plus encore avec les cassures des brins d'ADN. Aucune corrélation n'a été notée en ce qui concerne les deux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (dna-ligase et topoisomérase) et le taux de dommage de l'ADN.

L'analyse de corrélation entre l'embryotoxité et l'expression génique des 4 gènes d'intérêt étudiés est présentée dans la figure 6.4.9. Les résultats ont révélé des relations significatives entre l'embryotoxicité et les deux gènes associées à la mort cellulaire programmée, caspase-3 ($r= 0,73$; $p<0.01$) et p53 ($r= 0,93$; $p<0.01$). En outre, une corrélation significative a été noté entre les deux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN DNA-Ligase et topoisomérase ($r= 0,96$; $p<0.01$).

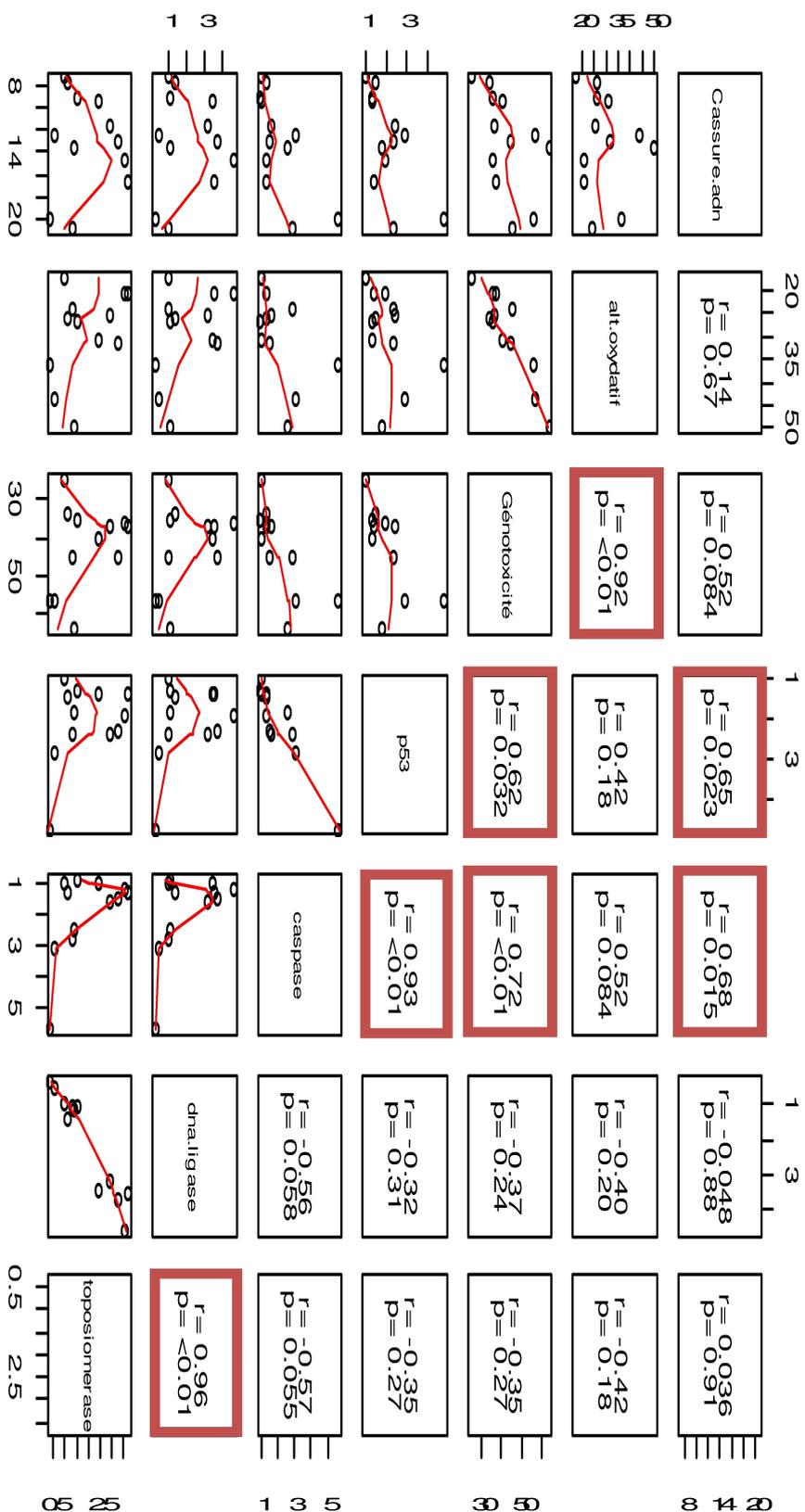


FIGURE 6.4.8 – Les corrélations établies entre les niveaux d'altération de l'ADN et le niveau d'expression des 4 gènes étudiés après exposition à différentes températures, au cuivre et/ou l'argent. La case Génotoxicité représente l'ensemble des altérations d'ADN (cassures des brins d'ADN et altérations oxydatifs) ; la case alt. oxydatif représente l'altération oxydative de l'ADN.

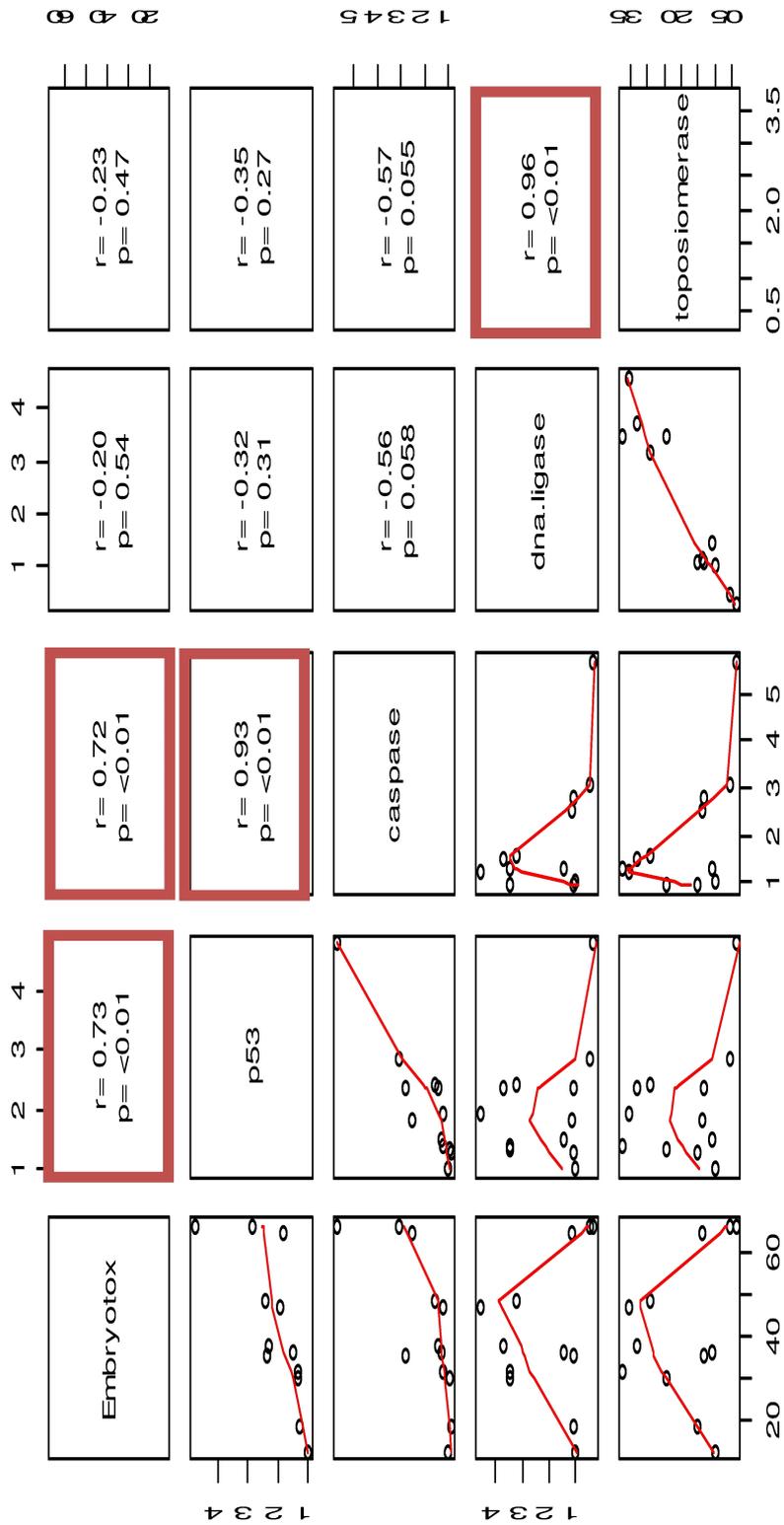


FIGURE 6.4.9 – :Les corrélations établies entre l'embryotoxicité et le niveau d'expression des 4 gènes étudiés après exposition à différentes températures, au cuivre et/ou l'argent.

6.5 Discussion :

L'objectif de la présente étude a été d'évaluer les effets génotoxiques d'une contamination métallique (cuivre et argent) et de l'accroissement de température chez les embryons et larves de moules *M. galloprovincialis*. Pour cela, les biomarqueurs d'altération et de réparation de l'ADN ont été analysés en utilisant deux approches différentes : (1) le test des comètes pour mettre en évidence les niveaux et les types d'altérations (cassures et oxydations) et (2) la RT-PCR pour évaluer le profil d'expression de 4 gènes d'intérêt impliqués dans des mécanismes d'apoptose et/ou de réparation de l'ADN. En parallèle, une évaluation des effets embryotoxiques des contaminants a été conduite de façon à mettre en relation les effets génotoxiques et embryotoxiques.

En termes d'embryotoxicité, les malformations des larves-D ont été décrites comme l'un des paramètres de toxicité les plus utiles chez les mollusques bivalves. Différents types d'anomalies peuvent être distingués : anomalies du manteau, de la coquille ou de la segmentation (arrêt de développement) (His et al., 1999a). Dans cette étude, le pourcentage de malformations larvaires a été présenté sous forme de la somme des différentes anomalies, sans distinction du type de malformations. Il a été montré que les stades précoces de développement des bivalves sont plus sensibles aussi bien au stress thermique (Byrne & Przeslawski, 2013; Gamain et al., 2016a; Chapitre 4 de la présente étude) que métallique (Nadella et al. 2009; Prato & Biandolino 2010; Mai et al. 2012; Gamain et al. 2016b,a; Chapitre 4 de la présente étude). Les données d'embryotoxicité obtenues, chez les larves-D de moule méditerranéenne, dans la présente étude sont en accord avec nos résultats précédents (Chapitre 4 de la présente étude). Nos résultats confirment également que 18 °C est une température optimale pour le développement embryonnaire de la moule méditerranéenne (His et al. 1997; Chapitre 4 de la présente étude). Avec un pourcentage de malformations qui augmente de 13 % à 18 °C pour atteindre 46,6 % à 22 °C, les stades larvaires de cette espèce apparaissent très sensibles à l'accroissement de température. Certaines données sont disponibles concernant la toxicité du cuivre chez les larves de moules (Prato & Biandolino, 2010; Fabbri et al., 2014b). Cependant, à notre connaissance, aucun travail n'a été mené sur les effets embryotoxiques de l'argent chez les stades larvaires de la moule méditerranéenne. Le mélange des CE10 des deux métaux provoque 31.7 % de malformations, ce qui confirme nos résultats précédents d'un effet additif des deux métaux. Nos résultats sont cohérents avec ceux de Coglianesse & Martin (1981). La toxicité des métaux augmente significativement ($p < 0,05$) avec l'augmentation de température. L'effet de la température sur la sensibilité des espèces aquatiques aux polluants a déjà été documenté dans le contexte écotoxicologique (Cairns et al., 1975; Negri et al., 2013; Banni et al., 2014a). Cependant, seules quelques études ont décrit les interac-

tions entre la température et les métaux chez les stades précoces de développement (Hrs-Brenko et al., 1977; Hallare et al., 2005).

Outre la pollution chimique, d'autres facteurs de stress tels que les variations de la température peuvent également affecter l'état physiologique et la survie des espèces aquatiques (Morris & Oliver, 1999). En tant que mécanisme conduisant à des troubles du développement et de mortalité embryonnaire, les dommages à l'ADN causés par un stress thermique et métallique (Cu, Ag) chez les larves de moule ont été étudiés en utilisant le test des comètes (Anderson & Wild, 1994). Les cassures des brins d'ADN et les dommages oxydatifs ont été retenus comme marqueurs de l'état d'endommagement de l'ADN des cellules.

Les dommages de l'ADN pourraient avoir des effets sur la croissance, le développement et la reproduction des espèces aquatiques. Les résultats de cette étude ont montré un niveau basal de dommages à l'ADN en condition contrôle à 18 °C de l'ordre de 7,3 %. Ces dommages peuvent être générés au cours du cycle de vie normal des cellules et peuvent également être liés au traitement des cellules notamment lors de la dissociation cellulaire nécessaire à la mise en œuvre du test des comètes. Par ailleurs, nos résultats ont montré qu'une faible augmentation de température n'induit pas une augmentation significative des cassures des brins d'ADN. Cependant, à 22 °C le pourcentage des cassures des brins d'ADN est significativement plus élevé ($p < 0,05$) atteignant 14,8 %. Toutefois, les altérations oxydatives de l'ADN ont été significativement induites ($p < 0,05$) dès la température de 20 °C avec un pourcentage de 35,6 % par rapport à 24,6 % à 18 °C. Yao & Somero (2012) ont mesuré, par test des comètes, le taux de cassures de brins d'ADN dans les hémocytes des adultes de deux espèces de moules *Mytilus galloprovincialis* et *Mytilus californianus* suite à un stress thermique. Ils ont montré qu'aussi bien l'augmentation que la diminution de température induit un accroissement significatif des cassures des brins d'ADN avec le plus fort taux de dommages (50,3 %) enregistré après 8 h d'exposition à 32 °C. Chez les organismes ectothermes, tels que la moule, le stress thermique peut entraîner une augmentation des niveaux intracellulaires d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) qui conduit par conséquent à un stress oxydatif (Regoli et al., 2011). Les EROs peuvent endommager les lipides, les protéines et l'ADN. Les dommages oxydatifs de l'ADN sont des lésions d'une importance majeure qui peuvent conduire à une altération de la fonction cellulaire ou même l'apoptose (Regoli & Giuliani, 2014). L'utilisation de l'enzyme fpg avec le test des comètes facilite la détection des dommages oxydatifs de l'ADN. Elle peut apporter des informations importantes concernant la contribution relative des dommages oxydatifs de l'ADN par rapport à l'ensemble des dommages de l'ADN. Bien que le nombre d'études sur les effets de la température sur les organismes marins aient augmenté après les prévisions du GIEC, les données dans la littérature à propos des effets sur l'intégrité de l'ADN des organismes aquatiques

sont très limitées.

Le cuivre est un métal essentiel pour le fonctionnement normal des cellules, mais il peut être dangereux et toxique lorsqu'il est présent à forte dose, entraînant des dommages aux biomolécules, en particulier à l'ADN (Lesser, 2006). Son potentiel toxique est lié à sa capacité à générer un stress oxydatif en catalysant la production des EROs (Bertoncini & Mene, 1995; De Vizcaya-Ruiz et al., 2003) et/ou à cliver directement des acides nucléiques (Sagripanti et al., 1991). Des données expérimentales suggèrent que ces composés interagissent directement avec l'ADN. Cependant, les interactions moléculaires et les modes de liaison spécifiques ne sont pas clairement établis (Arnaudeau et al., 2000). A ce jour, les données concernant les effets génotoxiques de ce métal chez les espèces marines sont encore rares dans la littérature, en particulier chez les stades précoces de développement. Seules quelques études de génotoxicité ont été réalisées avec des moules adultes (Bolognesi et al., 1999), les larves de moule *M. edulis* (Jha et al., 2000) et récemment chez des larves d'huitres (Akcha et al., 2012; Mai et al., 2012). Les résultats de la présente étude n'ont mis en évidence aucune augmentation significative des cassures des brins d'ADN chez les larves exposées à une concentration modérée de cuivre (9,55 µg/L) par rapport à la condition contrôle. Cependant, une augmentation significative des dommages oxydatifs a été observée chez les larves de moules exposées dans les mêmes conditions, ce qui confirme les effets oxydatif du cuivre sur l'ADN. Une étude récente menée sur les larves d'huitre a montré que le niveau de dommages de l'ADN a significativement augmenté avec l'augmentation de concentration en cuivre passant de 13,9 % à la plus faible concentration étudiée (0,1 µg/L du cuivre) à 19,5 % à la concentration la plus élevée étudiée (10 µg/L) (Mai et al., 2012). Les métaux tels que le cuivre, le fer et le nickel ont été montré pour induire des dommages oxydatifs à l'ADN, générant des cassures double brin et des lésions de base, indépendamment ou via des enzymes du cytochrome P450 (Lloyd & Phillips, 1999).

Quant à la génotoxicité de l' Ag^+ , nos résultats montrent des résultats similaires à ceux obtenus avec le Cu^{2+} . Aucune différence significative par rapport au groupe contrôle n'a été observée pour l'induction des cassures des brins d'ADN, mais une augmentation significative des altérations oxydatives a été bien noté. Pour les deux types d'altérations évaluées dans la présente étude, l'effet génotoxique du Cu est plus marqué que celui de l'Ag avec une différence significative pour les altérations oxydatives à l'ADN. L' Ag^+ est bien connu pour être très toxique pour les espèces aquatiques. Plusieurs études ont mis en évidence son effet génotoxique, en particulier par sa capacité d'interagir avec les acides nucléiques (Jensen & Davidson, 1966; Arya & Yang, 1975; Dattagupta & Crothers, 1981; DiRico et al., 1985; Swasey et al., 2015). L'ion Ag^+ a tendance à se lier sélectivement à la cytosine formant ainsi des complexes C-Ag-C (Zhang et al., 2014). Gomes et al. (2013) ont mené

une étude sur les effets génotoxiques des deux formes nanoparticulaires et ionique de Cu et d'Ag, chez les moules adultes *M. galloprovincialis*. Leurs résultats ont montré que les deux formes induisent des cassures et dommages à l'ADN dans les hémocytes des moules avec une toxicité plus marquée pour la forme ionique des deux métaux. L'hypothèse pour expliquer la toxicité de l' Ag^+ est que suite à sa pénétration dans la cellule, ce métal est accumulé dans les mitochondries et provoque une perturbation de la chaîne respiratoire résultant dans la production de radicaux libres et donc un stress oxydatif (Aktepe et al., 2014). De plus, l'ion Ag^+ a une forte tendance à interagir avec les groupes sulfhydriles des enzymes et les bases contenant du phosphore, donc il est probable que l'Ag puis se provoquer des altérations à l'ADN par la formation des EROs, ou causant des dommages en se liant à l'ADN (Hossain & Huq, 2002) ou en inhibant la synthèse de l'ADN (Hidalgo & Domínguez, 1998), ce qui empêcherait la division cellulaire et la réplication de l'ADN (Bar-Ilan et al., 2009). Contrairement à l'effet du métal seul, nos résultats montrent que la contamination au mélange des deux métaux induit des cassures des brins d'ADN et augmente significativement le pourcentage des brins d'ADN dans la queue. A notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur l'effet génotoxique de mélange des deux métaux. En outre, les données de notre étude, montrent que la température amplifie l'effet génotoxique des métaux, que ce soit seul ou en mélange. Par exemple une étude menée sur les hémocytes d'une moule d'eau douce « *Dreissena polymorpha* » a montré une augmentation des dommages de l'ADN après une exposition *in vitro* à l'hypochlorite de sodium et à une augmentation de la température avec un pic à ~27 % de dommage après 1 h d'exposition à 28 °C (Buschini et al., 2003).

La p53 est bien connue pour stimuler la réparation de l'excision de base (Zhou et al., 2001), par conséquent, la surexpression de p53 observée suite à l'exposition à 22 °C pourrait être une réponse à des cassures de l'ADN. Les données présentées dans cette étude démontrent la surexpression de l'ADN-ligase et la topoisomérase. Ceci soutient l'idée de la mise en place par la cellule d'une stratégie de défense contre le stress thermique. Il est bien connu que la plupart des réactions catalysées par des enzymes sont température-dépendantes (Keeton et al., 1993). Il a été montré que la réparation par excision de nucléotides chez la levure augmente avec l'augmentation de température (Giese et al., 1957). Toutefois, les données concernant la dépendance des mécanismes de réparation de l'ADN à la température chez les organismes aquatiques sont rares.

En ce qui concerne l'expression des gènes d'intérêt suite à une contamination métallique, nos résultats montrent que la contamination à l' Ag^+ n'induit l'expression d'aucun des gènes étudiés. En revanche, l'expression des deux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, ADN-ligase et la topoisomérase (Montecucco et al., 1992; Mohanty et al., 2008), sont significativement surexprimés suite à une expo-

sition à une concentration de cuivre ou du mélange Cu-Ag (Mix) à 18 °C. Les topoisomérases catalysent l'ouverture séquentielle et l'hybridation des deux brins d'ADN complémentaires respectivement, et remplissent des fonctions essentielles dans le maintien de la stabilité génomique (Wang et al., 2012). L'ADN-ligase catalyse la formation de liaisons phosphodiester entre des fragments d'ADN adjacents avec des terminaisons et structure appropriée (Montecucco et al., 1992). L'induction de l'expression de ces gènes de réparation de l'ADN pourrait expliquer en partie l'absence d'une augmentation significative des cassures de l'ADN chez les larves exposées au cuivre. Cependant, chez les larves exposées au mélange des deux métaux une augmentation significative des altérations à l'ADN a été notée. Récemment, Hertel-Aas et al. (2011) ont rapporté que les mécanismes de réparation des dommages de l'ADN indépendamment du facteur de stress qui les a induit, varient selon les tissus et les espèces et que les taux de réparation sont lésion-spécifiques. En général, il y a peu d'informations sur la régulation de la réparation de l'ADN chez les espèces présentant un intérêt écologique. À notre connaissance, cette étude est la première à mettre en évidence l'embryotoxicité, la génotoxicité et l'expression des gènes de réparation de l'ADN chez les larves de moules exposées à un stress thermique et métallique.

Nos données montrent que l'expression des gènes de réparation de l'ADN demeure significativement surexprimée suite à une faible augmentation de température (20 °C) chez les groupes exposés à une contamination métallique par le Cu ou l'Ag. Cependant, en cas de mélange des deux métaux on a constaté l'absence de l'expression de ces gènes ainsi qu'une surexpression du gène caspase3 impliqué dans l'apoptose. L'augmentation de température à 22 °C chez les larves exposées à un stress métallique, conduit à une répression des gènes de réparation de l'ADN et la surexpression significative des gènes apoptotiques caspase-3 et p53. Chez les mammifères, la protéine p53 joue un rôle central dans le contrôle de l'intégrité du génome (Kastan et al., 1992; El-Deiry et al., 1993). En effet, p53 présente plusieurs isoformes qui sont impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la cancérogenèse (Farcy et al., 2008). La nomenclature confirme la présence de ces différentes variantes chez *Mytilus spp* (Muttray et al., 2005; Rotchell & Ciocan, 2007; Banni et al., 2009). Il a été documenté que l'expression génique de la caspase-3 peut être induite chez les moules suite à un stress thermique (Kefaloyianni et al., 2005; Yao & Somero, 2012). Kefaloyianni et al. (2005) ont mis en évidence une forte induction de la caspase-3 dans le manteau des moules exposées au Cu^{2+} et cette induction a été fortement augmentée en condition de contamination métallique multiples accompagné d'un stress thermique.

Plusieurs études ont montré que le stress oxydatif peut conduire à l'apoptose, via notamment la libération du cytochrome c et l'activation de diverses caspases

(Jiang et al., 2004). Bien que, la mort cellulaire programmée par la voie des caspases, induite par diverses conditions de stress, est bien établie chez les mammifères (Jiang et al., 2004; Philchenkov, 2004), les données chez les invertébrés marins sont très limitées. D'une manière générale, la variation de profil d'expression génique en fonction de la température chez les moules exposées à une contamination métallique suggère que la régulation négative des gènes de réparation de l'ADN pourrait expliquer l'accumulation des dommages dans l'ADN des moules exposées au Cu et/ou à l'Ag à 22 °C. La régulation négative de ces gènes a été déjà documentée en association avec des dommages de l'ADN : par exemple la p53 dans des moules exposées au benzo (a) pyrène (Banni et al., 2009).

6.6 Conclusion :

Cette étude est la première à étudier les effets de la température, du cuivre et de l'argent sur l'induction des altérations de l'ADN chez les premiers stades de développement d'un invertébré marin écologiquement représentatif, *M. galloprovincialis*.

Notre étude suggère que les larves de moules exposées à une augmentation de température modérée peuvent avoir une capacité plus réduite à réparer les dommages à l'ADN induits par l'exposition à des génotoxiques. Cela est particulièrement pertinent dans le contexte de réchauffement climatique et de la pollution thermique. Enfin, il est important de noter qu'il y a beaucoup de molécules chimiques, autres que les métaux, qui peuvent interagir en plus de la température chez les animaux aquatiques et ces interactions pourraient également avoir des répercussions sur les réponses biologiques observées.

Chapitre 7

**Comportement natatoire et activité
Acétylcholinestérase chez les stades
embryo-larvaires de la moule
méditerranéenne *Mytilus*
galloprovincialis exposés au cuivre
et/ou à l'argent à différentes
températures.**

7.1 Introduction :

Les études écotoxicologiques ont traditionnellement porté sur l'évaluation des effets létaux aigus et/ou chroniques sublétaux des polluants plus particulièrement sur les paramètres de développement ou de reproduction (Lagadic et al., 1994; Kusk & Wollenberger, 2007; Lowe & Butt, 2007). Toutefois, ce genre d'évaluation sont à la fois coûteux et long. Avec la large gamme de contaminants dans les milieux aquatiques, il y a un besoin croissant d'outils qui soient rapides, moins coûteux et sensibles à une large gamme de composés, mais aussi indicatifs des effets potentiels sur la survie et la croissance des organismes. Les analyses comportementales semblent prometteuses pour satisfaire à ces exigences, et sont souvent retenues pour leur rapidité (Gerhardt, 2007) et leur sensibilité (Little et al., 1990; Little & Finger, 1990; Cleveland et al., 2005) par rapport aux méthodes toxicologiques traditionnelles d'évaluation des effets sur le développement et la reproduction.

Ces dernières années, des progrès considérables ont été réalisés dans les outils technologiques d'analyse comportementale (Crow & Alkon, 1978; Panula et al., 2006). De même, des progrès importants ont été réalisés dans la compréhension des relations entre le comportement des animaux et les conséquences physiologiques et écologiques (Brewer et al., 2001; Amiard-Triquet, 2009; Sloman & McNeil, 2012; McNeil et al., 2014). Cela a conduit à un intérêt grandissant dans l'utilisation des études du comportement pour les essais de toxicologie aquatique. Les réponses comportementales des organismes aquatiques ont été même proposées comme des études prédictives des nouvelles substances (Cairns & Gruber, 1980; Kramer et al., 1989; Diamond et al., 1990; Van der Schalie et al., 2001; Gerhardt, 2007).

Les paramètres comportementaux des organismes aquatiques sont de plus en plus pris en considération étant des indicateurs sensibles et précoces (Cairns & Gruber, 1980; Kramer et al., 1989; Diamond et al., 1990; Van der Schalie et al., 2001). En fait, la majorité des invertébrés aquatiques présentent une phase larvaire-planctonique au début de leur vie. Malgré les faibles capacités natatoire des invertébrés planctoniques (1 à 10 $mm.s^{-1}$), les larves peuvent se disperser sur de grandes distances ce qui a des implications importantes pour leur écologie et leur évolution (North et al., 2008; Moksnes et al., 2014).

Le développement comportemental est lié au développement du système nerveux (Weis, 2014). En fait, les niveaux de neurotransmetteurs et les fonctions enzymatiques sont reliés aux réponses comportementales, il est donc probable que les modifications des neurotransmetteurs induits par des agents toxiques se traduisent par des altérations comportementales (Weis et al., 2001; Diehl et al., 2016). L'un des indicateurs les plus communs de l'altération de la fonction neuronale est l'altération de l'AChE. L'activité enzymatique de l'AChE a été démontrée être altérée

par des contaminants environnementaux tels que les métaux (Olson & Christensen, 1980; Devi & Fingerman, 1995; Frasco et al., 2005), et surtout l'exposition aux insecticides (Meng et al., 2015; Mohamed et al., 2015) et carbamates (Saxena et al., 2015; Arora et al., 2016).

Dans la présente étude on a fixé trois principaux objectifs :

- Le développement et l'optimisation d'un logiciel pour l'analyse du comportement natatoire des larves D de moule en utilisant des enregistrements vidéo.
- L'évaluation des changements dans le comportement natatoire et l'activité de l'AChE chez des larves de moule méditerranéenne exposées au cuivre et à l'argent, pour différencier les effets possibles de ces métaux individuellement ou en mélange à différentes températures d'exposition.
- L'étude du lien mécaniste probable entre l'activité AChE et le comportement natatoire des larves-D de moule.

7.2 Protocole expérimental :

L'évaluation de l'effet toxique des deux métaux modèles, cuivre et/ou argent, a été réalisé en utilisant une concentration de cuivre CE20 Cu = 9,54 µg/L ; une concentration d'argent CE20 Ag = 2,55 µg/L et le mélange des CE10 des deux composés : CE10 Cu = 6,67 µg/L + CE10 Ag = 1,47 µg/L. L'effet de l'augmentation de température, chez les premiers stades de développement de la moule, a été évalué en réalisant les expositions à trois températures différentes : 18 (température optimale de développement) ; 20 et 22 °C pendant 48 h jusqu'au stade larve-D à l'obscurité. Le choix de ces conditions a été expliqué dans la partie Bases Méthodologiques.

Pour mener à bien l'analyse du comportement natatoire des larves-D de moule, une série de vidéos issues de plusieurs expériences ont été utilisés (tableau 7.1). Afin de s'assurer de l'absence d'un stress supplémentaire dû à la variation de température au cours de l'acquisition des vidéos, la température ambiante de la salle a été maintenue à la température d'exposition, et la micro-plaque n'a été sortie de l'enceinte qu'au moment de la prise de film.

Le niveau de l'AChE a été étudié chez des larves-D (48 h d'exposition) de 3 couples (4 réplicats biologiques). Environ 500.000 larves ont été utilisées par réplicat issus d'un seule couple de géniteurs et 3 expositions indépendantes ont été effectuées (tableau 7.1).

Suite à l'exposition aux métaux modèle étudiés (Cu, Ag) et à la température, des vidéos de 2 min ont été réalisées à l'aide du microscope Nikon Eclipse et du logiciel d'acquisition NIS Elément. Ensuite les vidéos ont été converties dans un format (AVI) utilisable par le logiciel d'analyse de comportement Image-J (le protocole est bien détaillé dans la partie Bases Méthodologiques). Différents paramètres ont

TABLE 7.1 – Conditions d'expositions et paramètres suivis appliquées pour les analyses comportementale et enzymatique (AChE).

Analyses	Nombre des conditions	Nombre de couples	Nombre des embryons / replicat	Temps d'exposition (h)	Paramètres suivis
Comportement	12	Variable selon condition (minimum 3 couples)	Variable selon condition (minimum 10 larves)	48 h post fécondation	Vitesses natatoire + Trajectoires de nage
Enzymatique	12	3	500.000	48 h post fécondation	Activité de l'AChE

été évalués à partir des vidéos notamment la vitesse moyenne, la vitesse maximale et le type de trajectoire natatoire. Le grossissement auquel ont été réalisées les vidéos ne permet pas de visualiser l'ensemble du micro-puits, de ce fait le nombre de larves suivies par puits pourrait se révéler faible et variable. Il a été fixé qu'une vidéo n'est exploitable que si le nombre de larves pris en compte est ≥ 10 larves. Les trajectoires n'étant pas déterminées par le logiciel, elles sont appréciées par l'expérimentateur sur chaque vidéo étudiée une à une. Trois catégories de trajectoires ont ainsi été déterminées (figure 7.2.1) :

- Surplace : les larves tournent sur elles-mêmes en agitant ces cils dans la même place.
- Trajectoire circulaire : les larves effectuent un tour complet sans déplacement latitudinal
- Trajectoire rectiligne : les larves effectuent un déplacement latitudinal

Le niveau de l'AChE a été mesuré en parallèle. Les procédures de prélèvement et de préparation des larves destinées à l'analyse de l'AChE ont été effectuées comme décrit dans la partie Bases Méthodologiques. L'AChE a été mesurée dans la fraction S9 des larves selon la méthode d'Ellman et al. (1961) adoptée pour lecture par micro-plaque comme expliqué dans la partie Bases Méthodologiques. Les données de comportement et de l'AChE ensuite ont été analysées pour des recherches de corrélation.

7.3 Traitement statistique

L'ensemble des données ont été traitées statistiquement à l'aide du logiciel R (<http://cran.r-project.org/>). Les résultats ont d'abord été testés pour la normalité

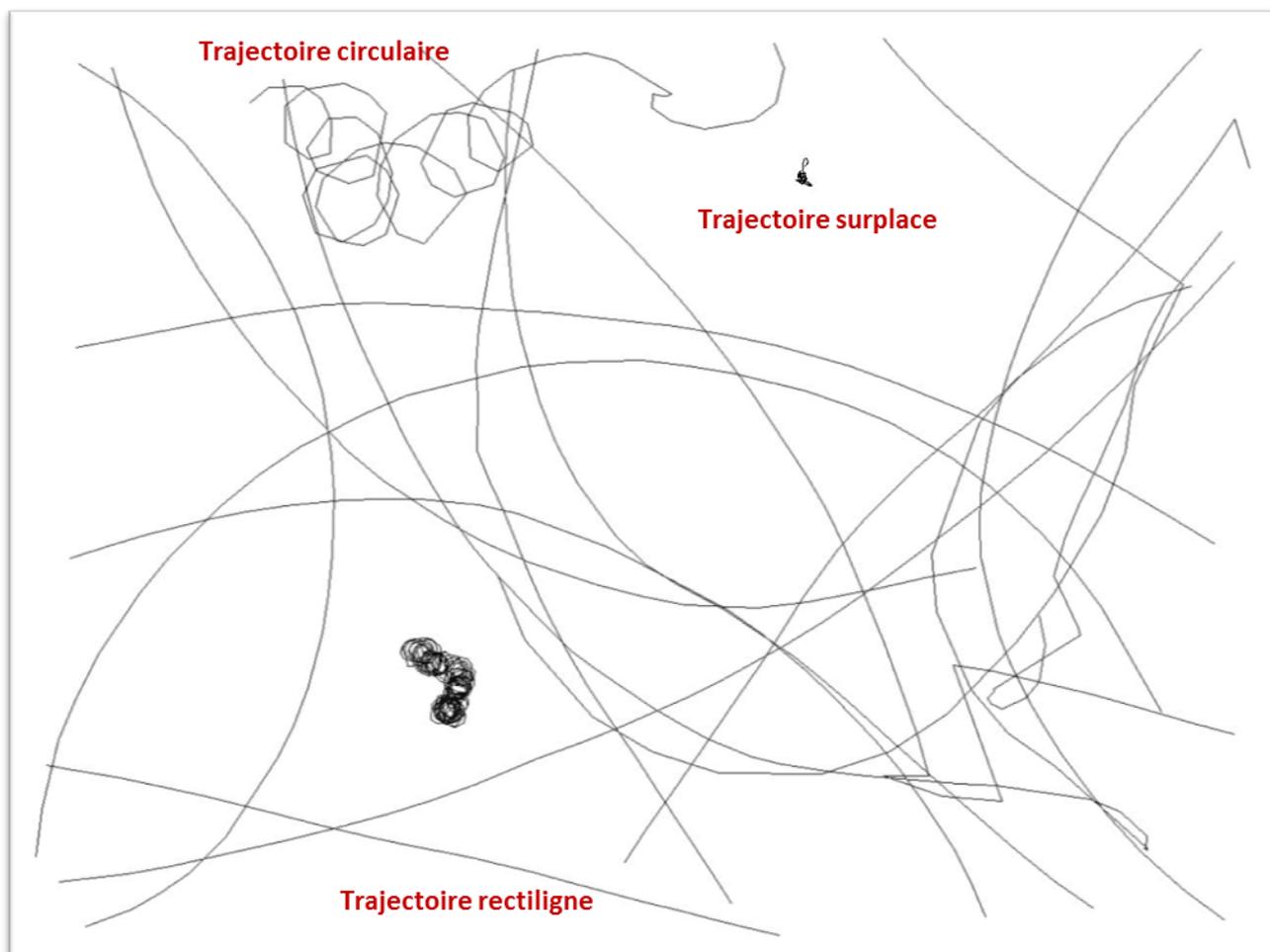


FIGURE 7.2.1 – Exemple de résultat d'analyse par le logiciel Image-J des différentes trajectoires possibles effectuées par les larves-D de moules.

(test de Shapiro-Wilk sur les résidus avec un risque de 1 %) et de l'homogénéité de la variance (test de Levene, risque de 5 %). Si les conditions d'utilisation sont respectées, des différences significatives entre les traitements ont été testés avec une ANOVA suivi du test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$). Dans le cas contraire, une analyse non-paramétrique par le test de Kruskal-Wallis a été utilisé ($p < 0,05$). L'existence et la force des relations entre les paramètres ont été déterminées par une analyse de corrélation de Pearson.

7.4 Résultats

7.4.1 Étude de comportement natatoire des larves-D de la moule

Les effets du cuivre, de l'argent, du mélange des deux métaux et de la température sur le comportement natatoire des larves-D de moules *M. galloprovincialis* ont été évalués à l'aide du logiciel Image-J. Les vitesses maximales et moyenne ainsi que les trajectoires natatoires ont été retenues comme des paramètres de l'activité natatoire des larves de moules.

Les effets de la température sur le comportement natatoire chez les larves-D de la moule sont présentés dans les figure 7.4.1 et 7.4.6 pour les vitesses et les trajectoires respectivement. Nos résultats ont montré une vitesse maximale de $0,59 \pm 0,06$ mm/s chez les larves en condition contrôle 18 °C. Aucune augmentation significative des vitesses maximales natatoires n'a été notée à 20 °C ($0,63 \pm 0,08$ mm/s). Cependant, à 22 °C la vitesse a significativement augmenté ($p < 0,05$) pour atteindre $0,74 \pm 0,06$ mm/s. Toutefois, aucune augmentation significative n'a été observée pour les vitesses moyennes quelle que soit la température ($0,4 \pm 0,055$ mm/s à 18 °C ; $0,43 \pm 0,07$ mm/s à 20 °C et $0,47 \pm 0,07$ mm/s à 22 °C). En condition contrôle 18 °C, les larves suivent majoritairement des trajectoires rectilignes (88 %). Avec l'augmentation de la température, on constate une augmentation significative des trajectoires circulaires déterminée de 13,3 % à 58,8 % respectivement à 18 et 22 °C. Les trajectoires rectilignes à 22 °C ont significativement diminués pour atteindre 36,6 %.

Les effets de cuivre et/ou de l'argent à 18 °C sur le comportement natatoire des larves sont présentés dans les figure 7.4.2 et 7.4.7. Avec le cuivre mais pas avec l'Ag on a constaté une diminution significative de la vitesse maximale des larves par rapport à la condition contrôle. Aucune différence significative des vitesses moyennes n'a été observée chez les larves exposées à la concentration d'argent et/ou de cuivre par rapport à la condition contrôle. Chez les larves exposées au Cu ou l'Ag, nos résultats montrent une diminution significative des trajectoires rectilignes par rapport à la condition contrôle. Les trajectoires circulaires ont significativement

augmenté chez les larves exposées au Cu (33,7 %) par rapport à la condition contrôle (13,3 %).

Les résultats de l'effet combiné de la température et des métaux sur le comportement natatoire des larves sont présentés dans les figures 7.4.3 ; 7.4.4 ; 7.4.5 et 7.4.8. L'augmentation de la température a augmenté significativement ($p < 0,05$) les vitesses maximales des larves pour les différentes conditions d'exposition testées. Les vitesses moyennes ont été significativement augmentées à 22 °C avec le cuivre et l'argent. Chez les larves exposées au mélange des deux métaux, l'augmentation de température n'induit aucune différence significative des vitesses moyennes. Chez les larves exposées au cuivre, on remarque une diminution significative des trajectoires rectiligne (64 %) avec la température 20 °C par rapport au témoin (88 %). Cependant, aucune différence significative n'a été constatée pour les trajectoires circulaires à 20 et 22 °C. Chez les larves exposées à l'argent et au mélange, nos résultats ont montré une diminution significative des trajectoires rectilignes et une augmentation significatives des trajectoires circulaires à 22 °C par rapport au témoin.

Dans toutes les conditions d'expositions, aucune différences significatives n'a été noté pour les trajectoires surplaces des larves de moules.

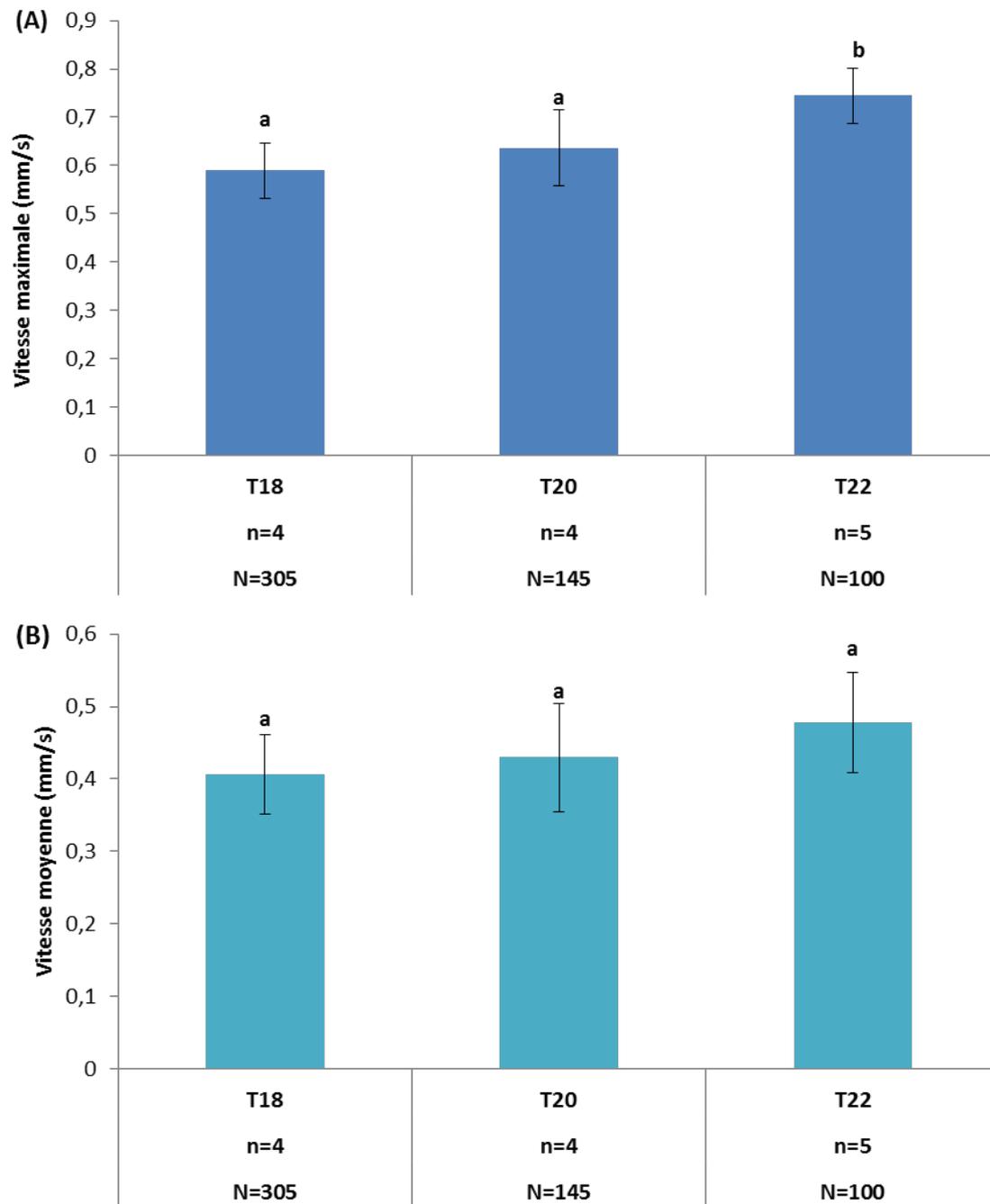


FIGURE 7.4.1 – Figure 6.2 : Vitesse maximale (A) et vitesse moyenne (B) (mm/s) mesurées sur les larves-D de moules méditerranéennes, exposées à différentes températures (18, 20 et 22 °C). N = Nombres de larves étudiées, n= nombre de couples par condition. Les données sont exprimées en moyenne de couples (n) ± Ecart Type. Des lettres différentes indiquant des différences significatives (p < 0.05, test post hoc de tukey) entre les différentes conditions.

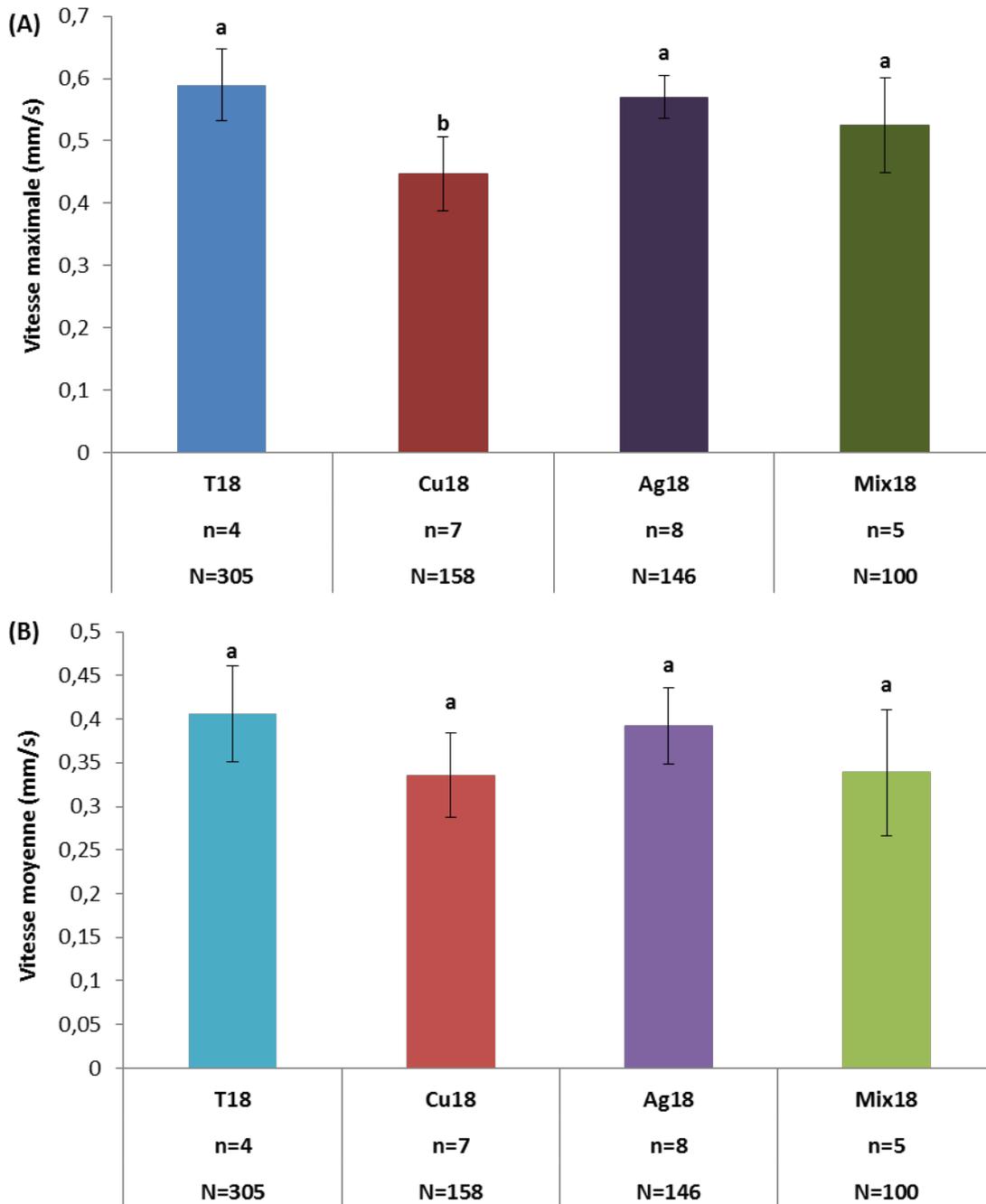


FIGURE 7.4.2 – Vitesse maximale (A) et vitesse moyenne (B) (mm/s) mesurées sur les larves-D de moules méditerranéennes, contrôle 18 °C et exposées au cuivre, l'argent et le mélange des deux métaux. N = Nombres de larves étudiées, n= nombre de couples par condition. Les données sont exprimées en moyenne de couples (n) ± Ecart Type. Des lettres différentes indiquant des différences significatives ($p < 0.05$, test post hoc de tukey) entre les différentes conditions.

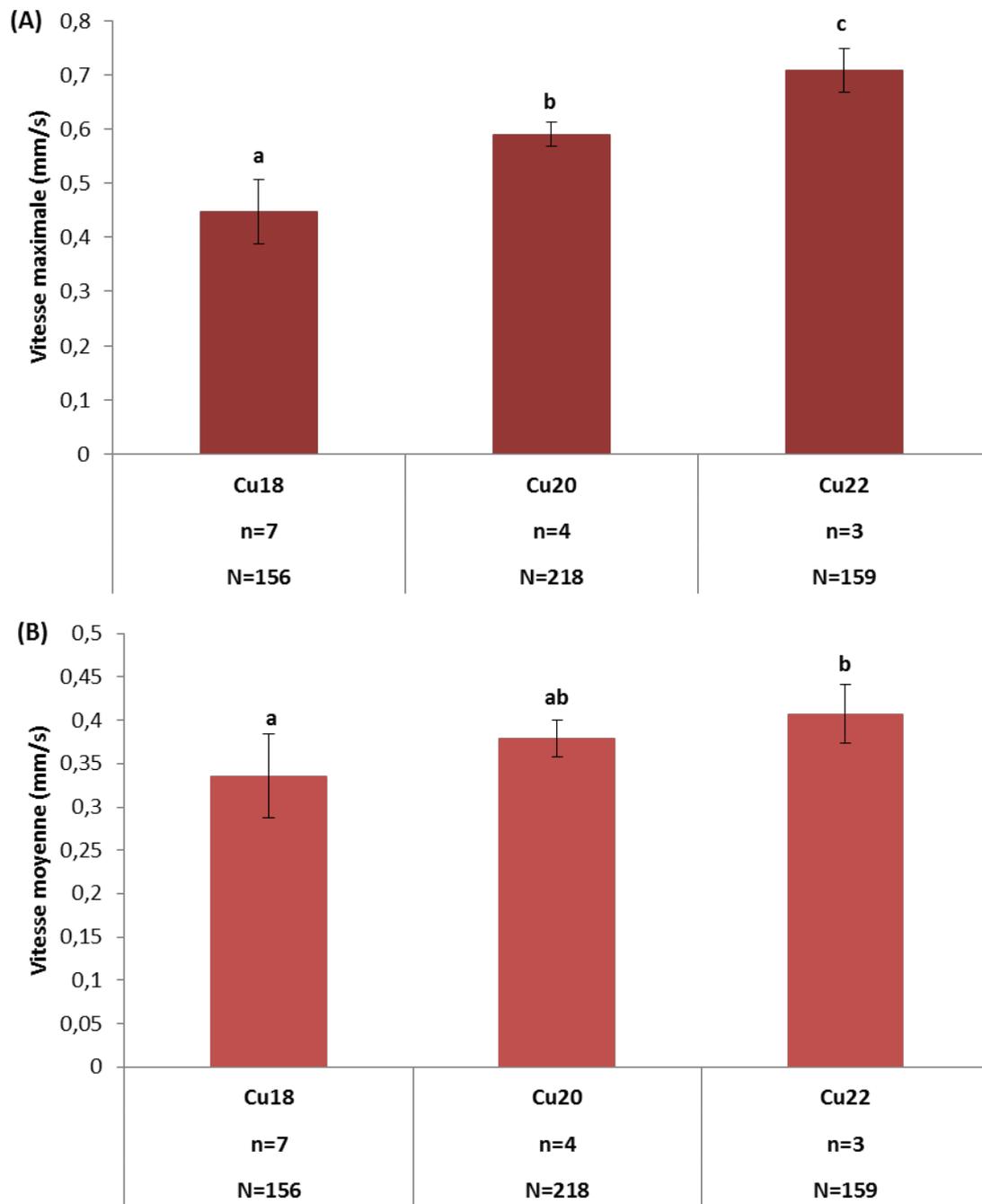


FIGURE 7.4.3 – Vitesse maximale (A) et vitesse moyenne (B) (mm/s) mesurées sur les larves-D de moules méditerranéennes, exposées à l'argent à différentes températures (18, 20 et 22 °C). N = Nombres de larves étudiées, n= nombre de couples par condition. Les données sont exprimées en moyenne de couples (n) ± Ecart Type. Des lettres différentes indiquant des différences significatives (p < 0.05, test post hoc de tukey) entre les différentes conditions.

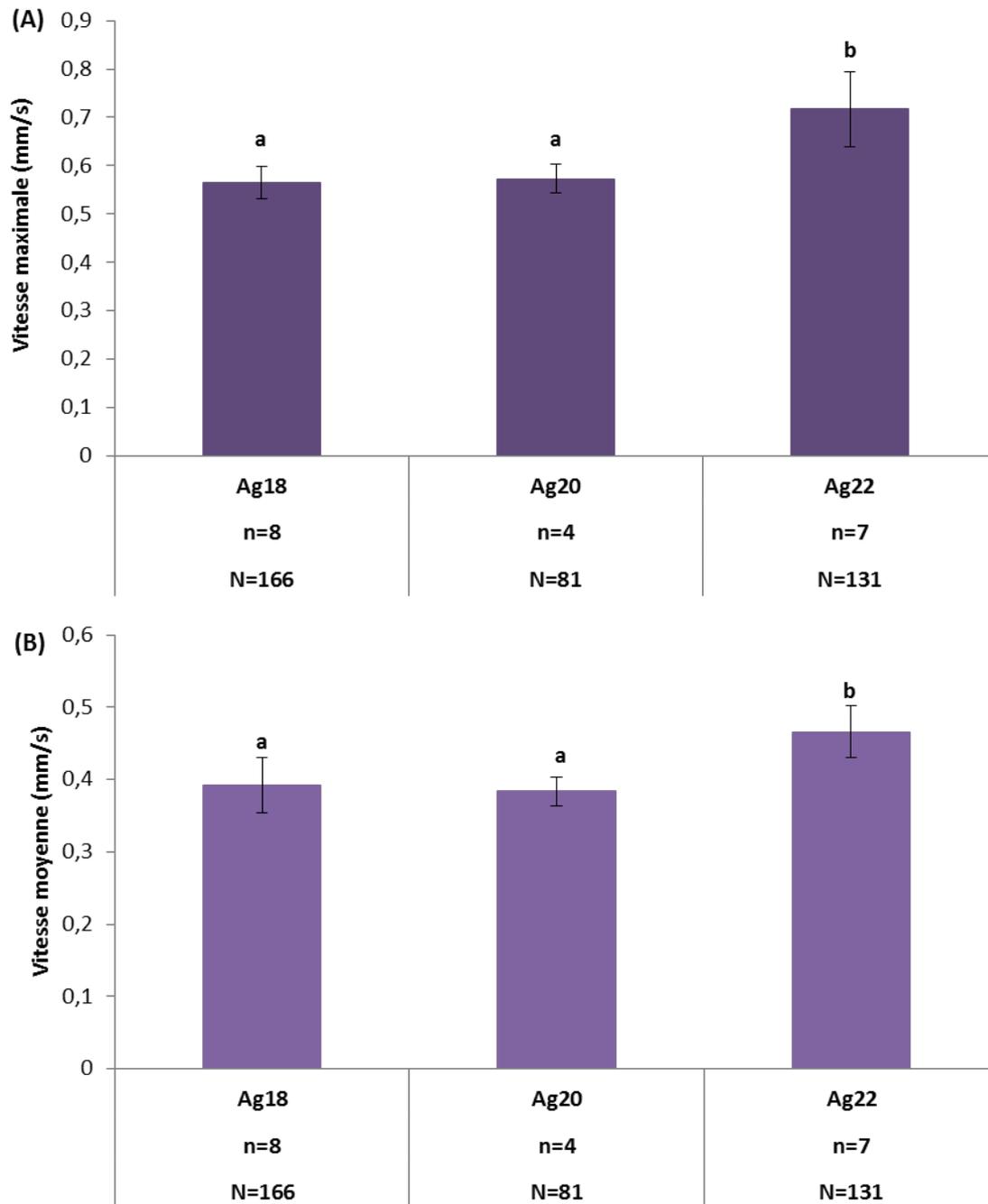


FIGURE 7.4.4 – Vitesse maximale (A) et vitesse moyenne (B) (mm/s) mesurées sur les larves-D de moules méditerranéennes, exposées à l'argent à différentes températures (18, 20 et 22 °C). N = Nombres de larves étudiées, n= nombre de couples par condition. Les données sont exprimées en moyenne de couples (n) \pm Ecart Type. Des lettres différentes indiquant des différences significatives ($p < 0.05$, test post hoc de tukey) entre les différentes conditions.

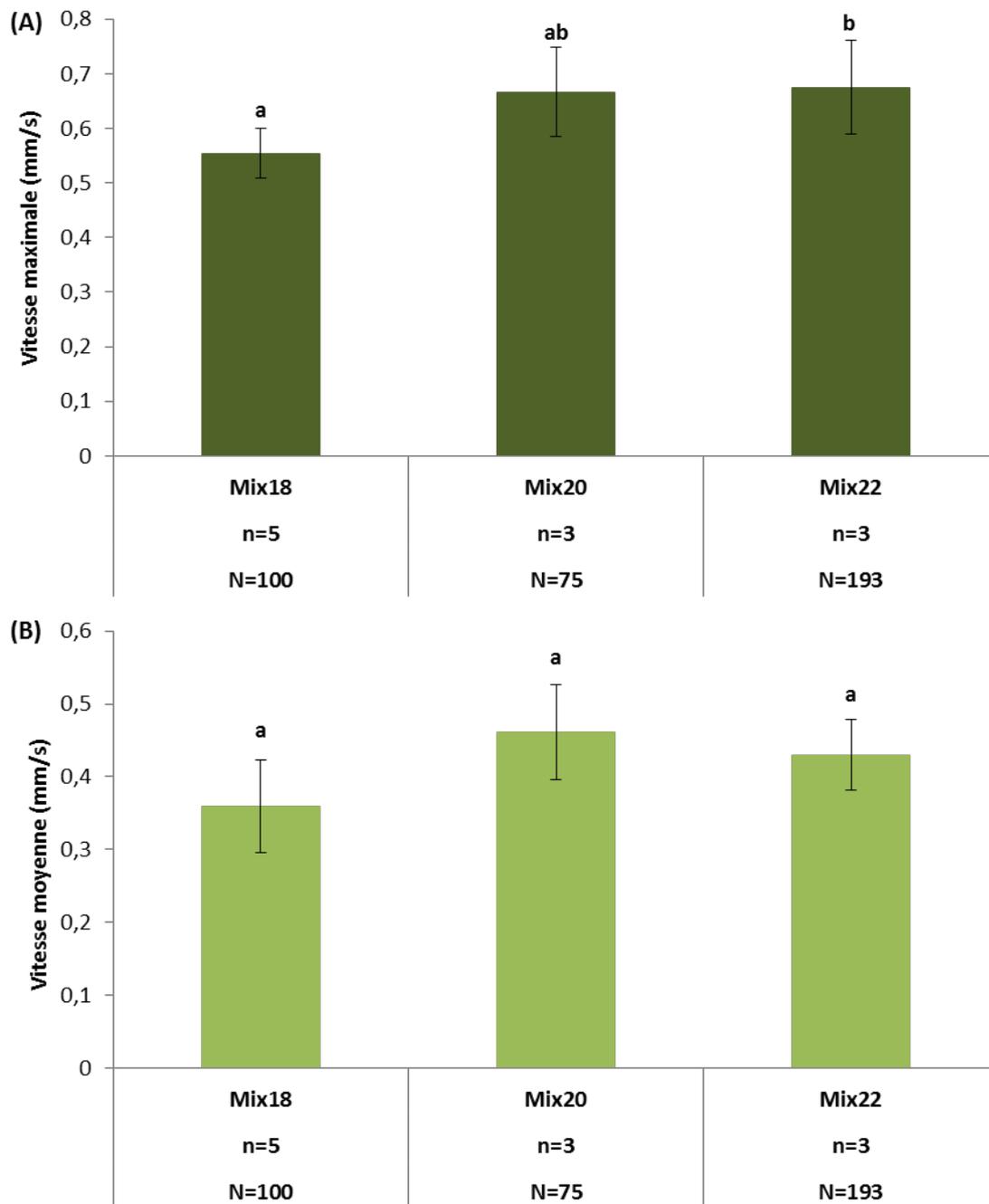


FIGURE 7.4.5 – Vitesse maximale (A) et vitesse moyenne (B) (mm/s) mesurées sur les larves-D de moules méditerranéennes, exposées au mélange Cu-Ag (Mix) à différentes températures (18, 20 et 22 °C). N = Nombres de larves étudiées, n= nombre de couples par condition. Les données sont exprimées en moyenne de couples (n) ± Ecart Type. Des lettres différentes indiquant des différences significatives ($p < 0.05$, test post hoc de tukey) entre les différentes conditions.

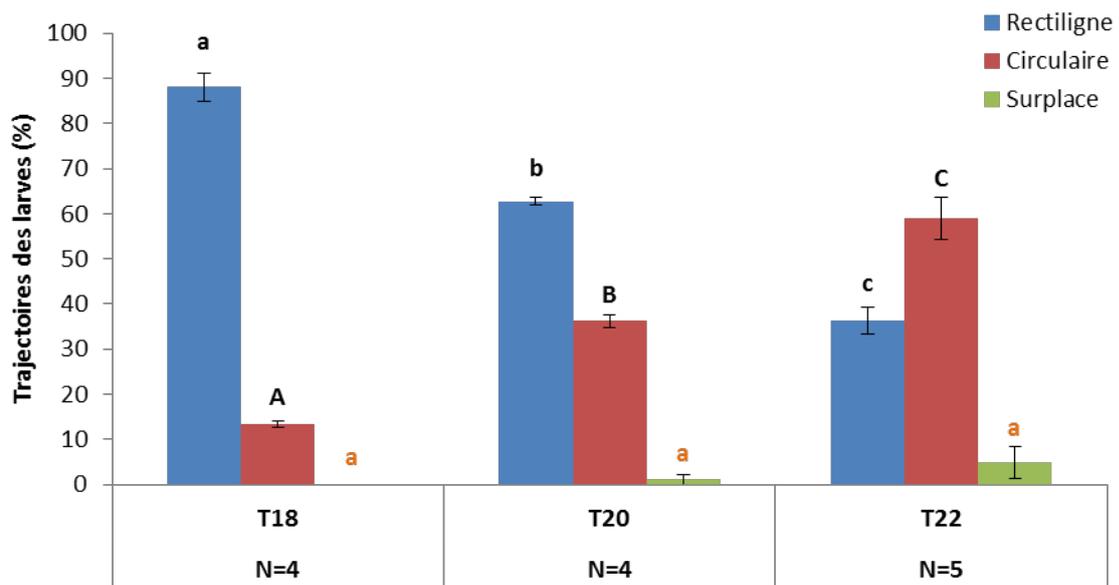


FIGURE 7.4.6 – Trajectoires observées (Rectiligne, Circulaire et Surplace) des larves-D de moules méditerranéennes exposées à différentes températures. (Moyenne \pm Erreur Standard, N= nombre de vidéos exploitées pour un couple de géniteurs, $p < 0.05$, test post hoc de tukey).

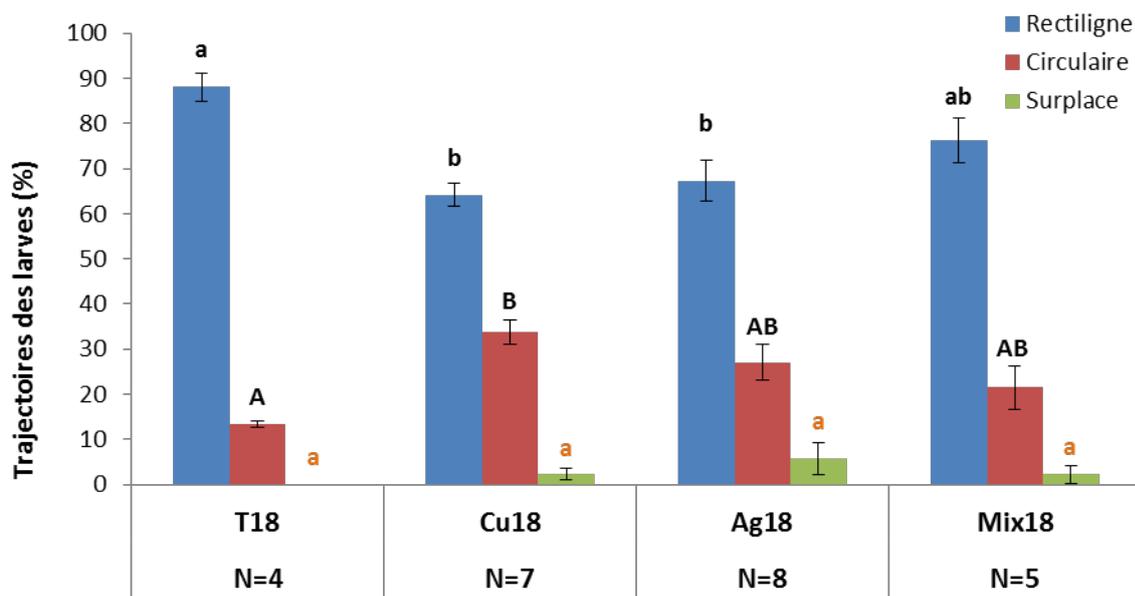


FIGURE 7.4.7 – Trajectoires observées (Rectiligne, Circulaire et Surplace) des larves-D de moules méditerranéennes, contrôle à 18 °C et exposées au cuivre, à l'argent et au mélange des deux métaux. (Moyenne ± Erreur Standard, N= nombre de vidéos exploitées pour un couple de géniteurs, $p < 0.05$, test post hoc de tukey).

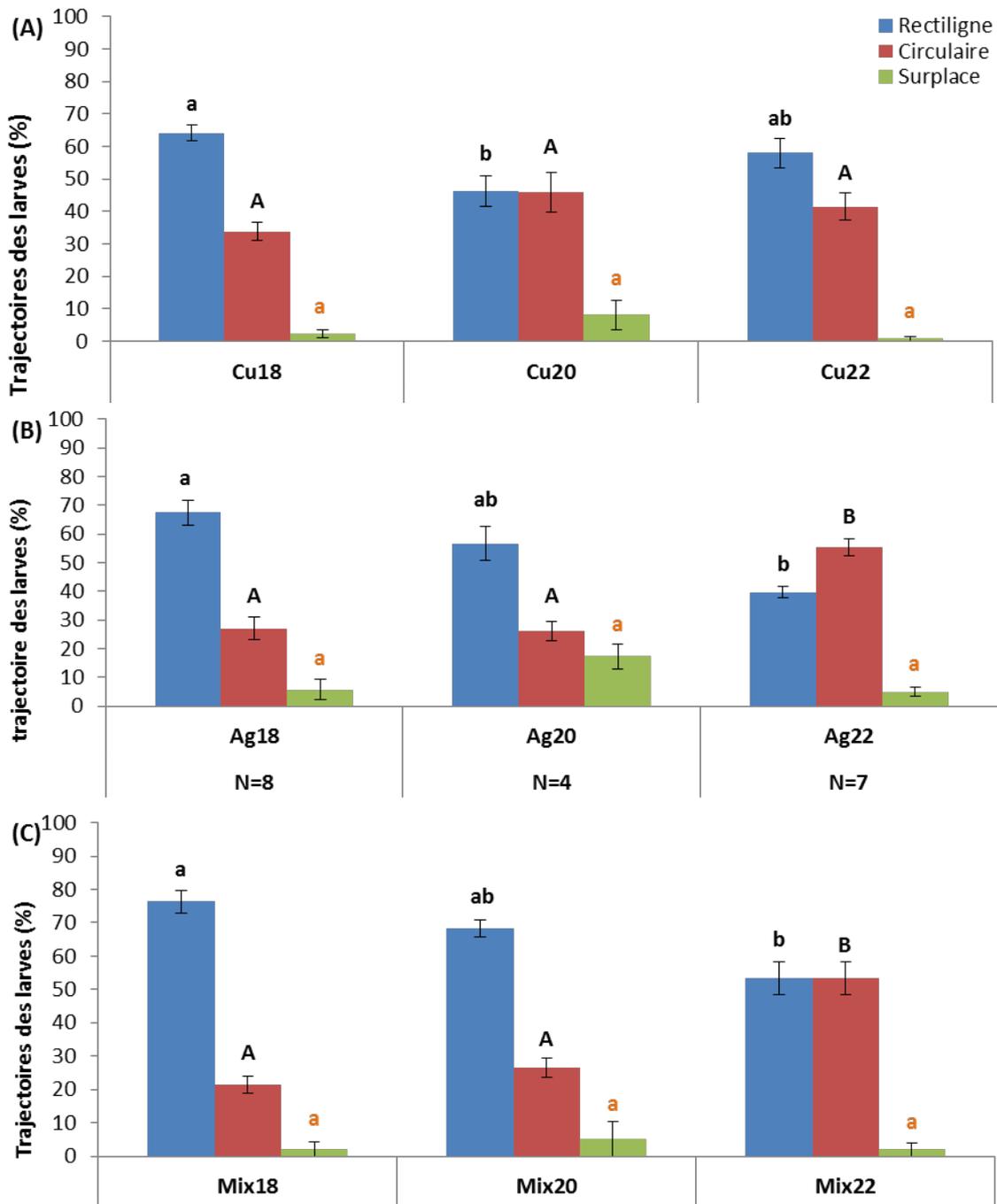


FIGURE 7.4.8 – Trajectoires observées (Rectiligne, Circulaire et Surplace) des larves-D de moules méditerranéennes exposées au cuivre (A), à l'argent (B) et au mélange des deux (C) à différentes températures. (Moyenne \pm Erreur Standard, N= nombre de vidéos exploitées pour un couple de géniteurs, $p < 0.05$, test post hoc de tukey).

7.4.2 Suivi de la variation de l'activité enzymatique de l'Acétylcholinestérase (AChE)

La réponse de l'activité de l'acétylcholinestérase chez les larves de moule *M. galloprovincialis* exposée pendant 48 h à un gradient croissant de température allant de 18 à 22 °C est représenté dans la figure 7.4.9. Nos résultats montrent que l'exposition à un gradient croissant de température a significativement ($p < 0,05$) stimulé l'activité AChE chez les larves de moule et la valeur a augmenté de 10,16 nmols/min/mg protéine pour atteindre 11,99 nmols/min/mg protéine entre à 18 et 22 °C.

La réponse de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) chez les larves de moule *M. galloprovincialis* exposée ou non pendant 48h au cuivre et/ou l'argent à 18 °C est représenté dans la figure 7.4.10. Cette figure montre que l'exposition au cuivre inhibe significativement ($p < 0.05$) l'activité AChE chez les larves de moule (7,99 nmols/min/mg protéine) par rapport à la condition contrôle 18 °C (10,16 nmols/min/mg protéine). Une inhibition significative plus importante (6,9 nmols/min/mg protéines) a été constatée chez les larves exposées au mélange de cuivre et d'argent. Cependant, aucune différence significative n'a été notée chez les larves exposées à l'argent seul (9,95 nmols/min/mg protéine).

La réponse de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) chez les larves de moule *M. galloprovincialis* exposées pendant 48 h au cuivre, à l'argent et au mélange des deux et à un gradient croissant de température allant de 18 à 22°C est représenté dans la figure 7.4.11. Les résultats montrent que l'effet combiné de la température et des métaux stimule significativement ($p < 0.05$) l'activité AChE chez les larves de moule quel que soit le métal considéré. La plus forte stimulation est noté lors de la co-exposition métal-22 °C.

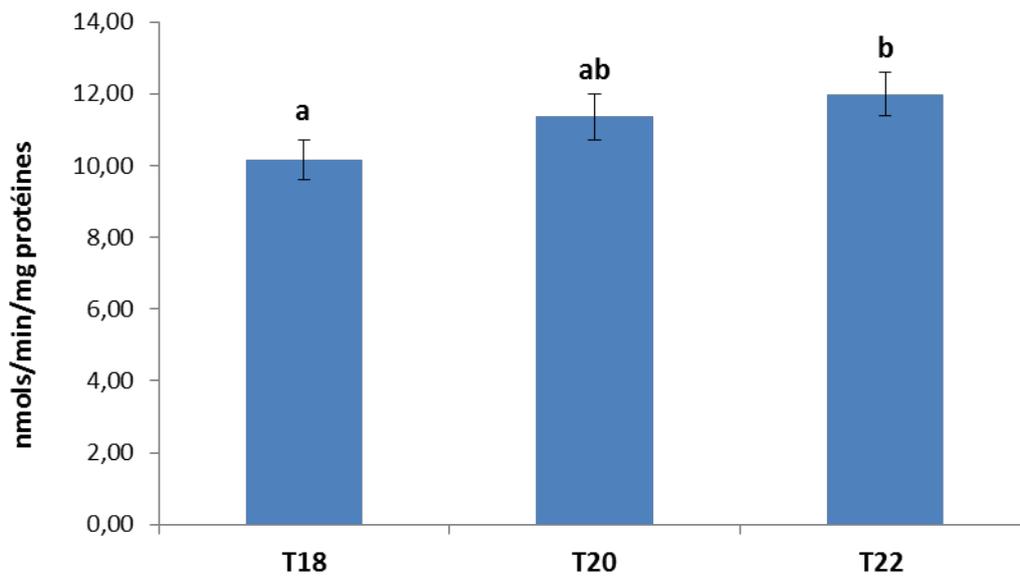


FIGURE 7.4.9 – Variations de l'activité enzymatique AChE chez les larves de moule *Mytilus galloprovincialis* exposées pendant 48 h à un gradient croissant de température (18, 20 et 22 °C). Les données sont exprimées en moyenne \pm Ecart Type. Des lettres différentes indiquent des différences significatives (N=3; $p < 0,05$, test post hoc de tukey) entre les différentes conditions.

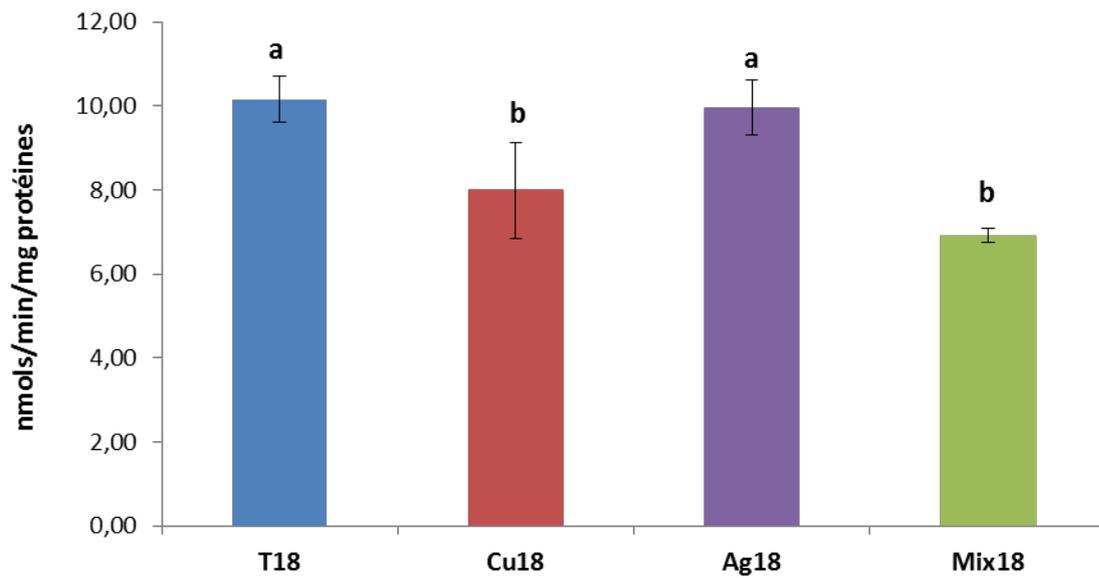


FIGURE 7.4.10 – Variations de l'activité enzymatique AChE chez les larves de moule *Mytilus galloprovincialis* exposées pendant 48 h au cuivre et/ou l'argent à 18 °C. Les données sont exprimées en moyenne \pm Ecart Type. Des lettres différentes indiquent des différences significatives (N=3 ; $p < 0,05$, test post hoc de tukey) entre les différentes conditions.

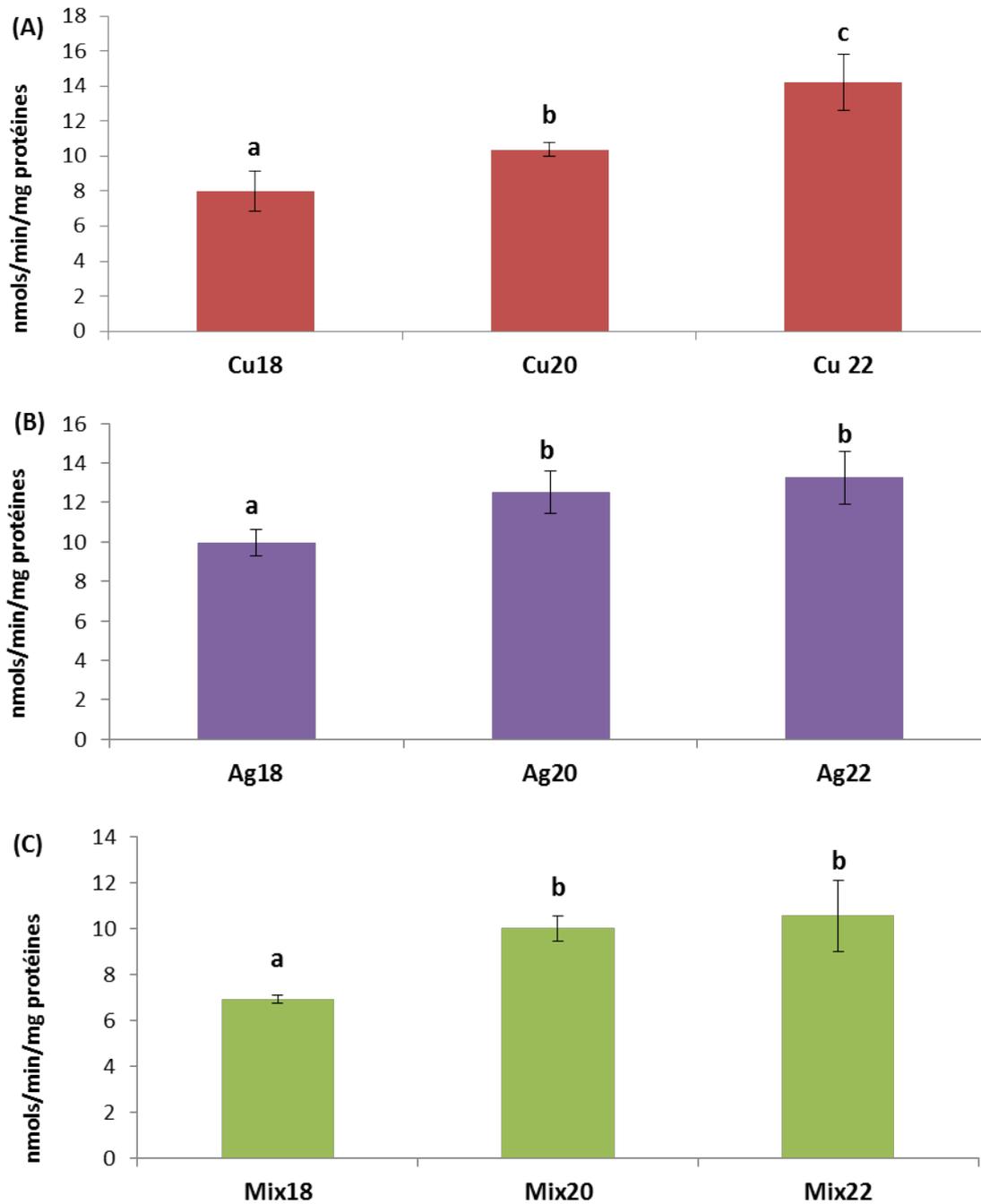


FIGURE 7.4.11 – Variations de l'activité enzymatique AChE chez les larves de moule *Mytilus galloprovincialis* exposées pendant 48 h au cuivre (A), à l'argent (B) et au mélange des deux (C) à un gradient croissant de température (18, 20 et 22 °C). Les données sont exprimées en moyenne \pm Ecart Type. Des lettres différentes indiquent des différences significatives (N=3; $p < 0,05$, test post hoc de tukey) entres les différentes conditions.

7.4.3 Relation entre le comportement natatoire des larves de la moule et l'activité enzymatique de l'Acétylcholinestérase (AChE)

Une analyse de corrélation de Pearson entre comportement natatoire et activité AChE a été effectuée et les résultats des analyses de corrélation sont présentés dans la figure 7.4.12. On remarque que l'activité enzymatique AChE est positivement corrélée avec les vitesses maximales ($r = 0,71$, $p < 0,01$). Une corrélation presque significative a aussi été noté avec les vitesses moyennes ($r = 0,56$; $p = 0,056$) et les trajectoires circulaires ($r = 0,56$; $p = 0,06$). En ce qui concerne la relation entre paramètres comportementaux étudiés, on a noté une forte corrélation positive entre les vitesses maximales et moyenne ($r = 0,9$, $p < 0,01$). Une anti-corrélation presque significative a été noté entre trajectoire rectiligne et vitesse moyenne ($r = -0,57$; $p = 0,052$).

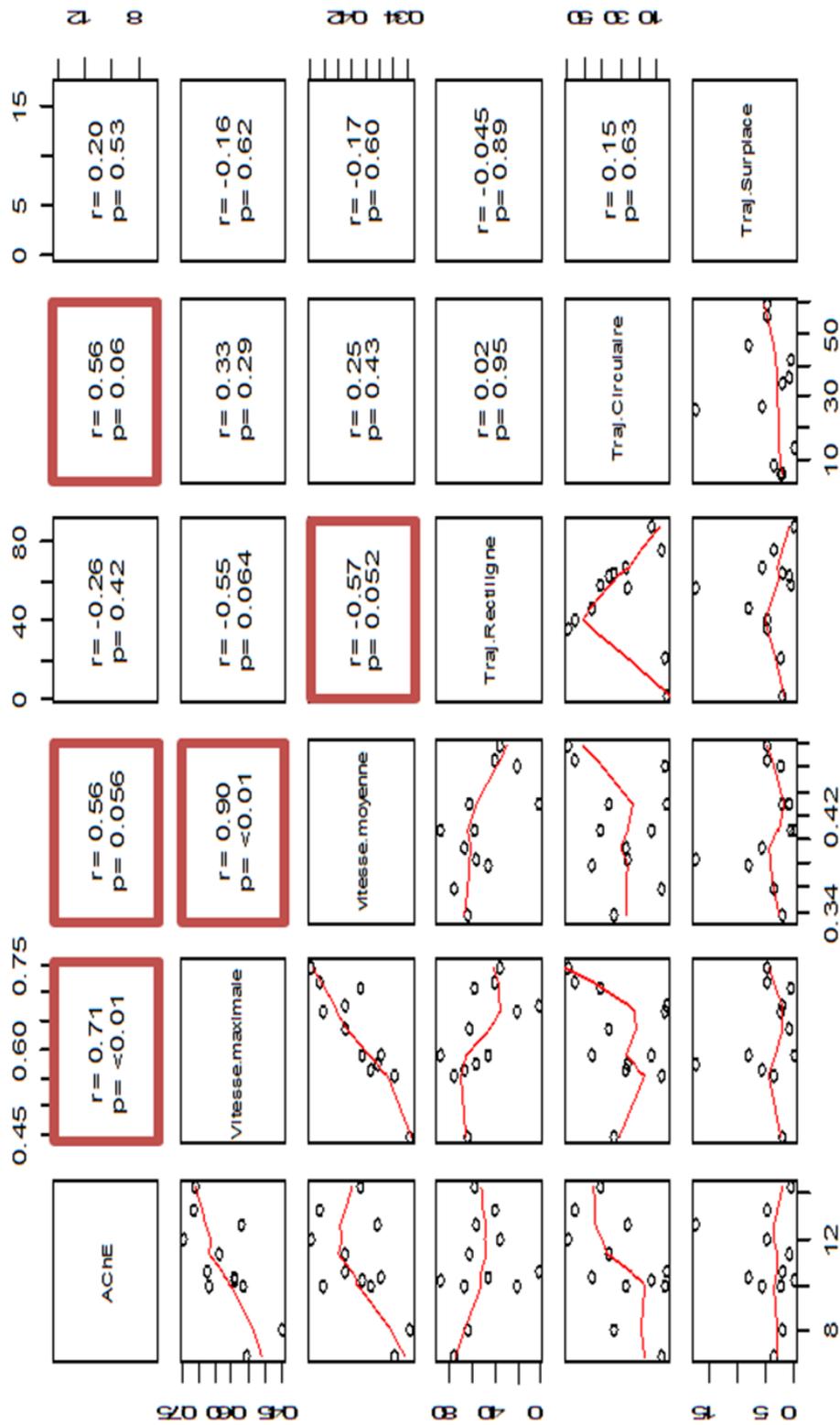


FIGURE 7.4.12 – Matrice de corrélation (Pearson) entre l'activité AChE et les paramètres du comportement natatoire des larves de moulles.

7.5 Discussion

Face à la croissance continue des rejets de composés toxiques dans l'environnement (Ritter et al., 2002; Lapworth et al., 2012), les tests de toxicité qui offrent une évaluation sensible et fiable d'un large éventail de contaminants sont particulièrement pertinents. Le plugin et la macro développés pour le logiciel Image-J dans cette étude représentent des outils opérationnels et efficaces pour évaluer les caractéristiques natatoires des larves-D de moules. La moule méditerranéenne *M. galloprovincialis* est un modèle d'importance économique et écologique. Sa distribution et son abondance sont relativement bien connus. Cependant, les effets des polluants sur le comportement natatoire des stades larvaires, élément clé pour trouver un substrat de fixation convenable et assurer la pérennité de l'espèce, est encore largement méconnue. Ce travail présente une première à mettre en évidence l'effet d'une augmentation de température et de contamination métallique sur le comportement natatoire des larves de moule.

Au cours de cette étude, nous avons pu distinguer trois types de mouvement : rectiligne, circulaire ou surplace. Dans des conditions naturelles, le mouvement de larves des invertébrés marins est une interaction complexe entre des mouvements horizontaux et verticaux influencés par les courants marins (Mileikovsky, 1973; Cowen & Sponaugle, 2009).

Les résultats ont montré qu'en condition contrôle 18 °C, les larves-D de moule effectuent principalement un mouvement rectiligne (88 %) avec une vitesse maximale de $0,59 \pm 0,057$ mm/s et une vitesse moyenne de $0,4 \pm 0,055$ mm/s. Les vitesses obtenues sont proches de celles mesurées par Mileikovsky (1973) qui a étudié la vitesse de déplacement des larves pélagiques des invertébrés benthiques marins : la plupart tombent dans la plage de 0,67 à 2,00 mm/s. L'effet de l'augmentation de température sur le comportement natatoire a été évalué dans la présente étude. Les résultats ont montré que la vitesse maximale a significativement augmenté ($p < 0,05$) avec l'augmentation la température ($0,74 \pm 0,057$ mm/s à 22 °C). De plus, l'augmentation de la température favorise un accroissement significatif des trajectoires circulaires de 13,32 % (18 °C) à 58,96 % (22 °C). Nos résultats sont en accord avec ceux de Sprung (1984) qui a mis en évidence une augmentation de la vitesse natatoire des larves de *M. edulis* avec l'augmentation de température : 1,25 mm/s à 6 °C et 3,3 mm/s à 18 °C. Selon Bayne (1965) le comportement des larves de moules est affecté par la gravité et la lumière, mais la direction de nage et l'ampleur de la réponse varient considérablement avec la température et l'âge des larves.

Chez les larves exposées au cuivre, une diminution significative de la vitesse maximale des larves par rapport à la condition contrôle a été notée. Aucune différence significative des vitesses moyennes n'a été observée chez les larves exposées à

l'argent et/ou au cuivre par rapport à la condition contrôle. Gamain (2016) a montré que l'exposition des larves d'huitre creuse à une faible concentration de cuivre (1 µg/L) augmente significativement leur vitesses maximale et moyenne, mais une concentration de 10 µg/L les diminuent. Chez les larves exposées au Cu ou à l'Ag, nos résultats montrent une diminution significative des trajectoires rectilignes par rapport à la condition contrôle. Nos résultats suggèrent un effet plus marqué du cuivre par rapport à l'argent sur le comportement natatoire des larves de moules. Cette hypothèse est appuyée par le fait que les trajectoires circulaires ont significativement augmenté seulement chez les larves exposées au Cu par rapport à la condition contrôle.

L'augmentation de température a augmenté significativement ($p < 0,05$) les vitesses maximales des larves pour les différentes conditions d'exposition métallique. Les vitesses moyennes ont été significativement augmentées à 22 °C seulement pour les larves exposées au cuivre ou à l'argent. Chez les larves exposées au cuivre, on remarque une diminution significative des trajectoires rectilignes avec l'augmentation de température. Cependant aucune différence significative n'a été constatée pour les trajectoires circulaires. Chez les larves exposées à l'argent et au mélange, nos résultats ont montré une diminution significative des trajectoires rectilignes et une augmentation significatives des trajectoires circulaires à 22 °C. His et al. (1989) ont suggéré qu'une nage circulaire ou en spirale des larves de la moule *Mytilus galloprovincialis* correspond à un comportement erratique des larves. L'augmentation de température augmente l'activité natatoire des larves mais ne favorise ni la survie ni le taux de croissance (Mann & Wolf, 1983). Cette idée a été confirmée par nos études ou on a mis en évidence une augmentation des malformations larvaires de *M. galloprovincias* avec l'accroissement de la température.

Étant donné la petite taille des larves, des études antérieurs ont supposé qu'ils sont transportés passivement par les courants océaniques (Williams et al., 1984). Cependant, des études récentes ont suggéré que la dispersion planctonique peut ne pas être aussi passive, mais plutôt que le comportement des premiers stades de vie pélagiques peut favoriser la rétention larvaire à proximité des habitats parentaux (Levin, 2006). La dispersion des larves, le succès du recrutement, la structure de la communauté et la propagation d'espèces envahissantes sont fortement impacté par les changement climatiques notamment l'accroissement de température (PRZESLAWSKI et al., 2008). Ces changements peuvent affecter la viabilité et la dispersion des larves sur des habitats inadéquats, où ils ne se métamorphoseront pas et finiront par mourir. L'augmentation de température et l'élévation du niveau de la mer peuvent modifier le transport larvaire en facilitant l'échange larvaire entre les communautés benthiques actuellement isolées par des barrières géographiques, ce qui pourrait entraîner le recrutement d'espèces envahissantes dans une zone autrefois isolée.

Les mécanismes impliqués dans la stimulation ou l'inhibition de l'activité natatoire, ne sont pas encore bien compris. Cela s'explique principalement par le fait que les paramètres comportementaux résultent de l'intégration d'un grand nombre de processus biochimiques et physiologiques et nerveux (Heath, 1995; Peakall, 1992) ainsi qu'une multitude de récepteurs de stimuli (Heath, 1995). Un polluant peut agir sur un ou plusieurs de ces récepteurs, influençant aussi sur le système nerveux en provoquant des lésions ou en modifiant le taux de production des neurotransmetteurs. En raison de son rôle important dans la transmission de l'influx nerveux dans les neurones cholinergiques, l'acétylcholinestérase est considérée comme très sensible aux changements biotiques et abiotiques (Greco et al., 2011; Dimitriadis et al., 2012).

Nos résultats montrent que l'exposition à un gradient croissant de température a significativement ($p < 0.05$) stimulé l'activité AChE chez les larves de moule et la valeur a augmenté de 10,16 nmols/min/mg protéine pour atteindre 11,99 nmols/min/mg protéine respectivement à 18 et 22 °C. Nos résultats ne sont pas en accord avec les résultats de Kamel et al. (2012) qui ont constaté une inhibition de l'activité AChE chez des moules *M. galloprovincialis* adultes exposées à un gradient croissant de température (18 à 26 °C). Une autre étude a montré qu'une exposition de larves de mouche arlequin *Chironomus riparius* à 3, 12 ou 22 °C induit une augmentation non significative de l'activité AChE. Les plus hauts niveaux d'activité AChE chez *Tigriopus brevicornis* ont été mesurés pendant l'été et les plus faibles en hiver (Forget et al., 2003). A notre connaissance, aucune étude de la variation d'AChE chez les stades larvaires des bivalves n'a été menée jusqu'à présent.

Les données de la présente étude montrent que l'exposition au cuivre inhibe significativement ($p < 0,05$) l'activité AChE chez les larves de moule par rapport à la condition contrôle à 18 °C. Une inhibition significativement plus importante (6,9 nmols/min/mg protéines) a été constatée chez les larves exposées au mélange Cu-Ag. Cependant, aucune différence significative n'a été notée chez les larves exposées à l'argent. Il est bien établi que l'inhibition de l'AChE est un biomarqueur d'exposition aux insecticides et carbamates (Key & Fulton, 2002; Meng et al., 2015; Saxena et al., 2015). Cependant, plusieurs études publiées au cours des dernières années ont démontré les effets d'autres contaminants, tels que les métaux sur l'activité AChE (Labrot et al., 1996; Diamantino et al., 2003; Frasco et al., 2005).

Tilton et al. (2011) ont évalué l'activité AChE musculaire chez le poisson zèbre et ont constaté que 6,3 ppb de cuivre provoque une inhibition de l'enzyme. La diminution de l'activité de l'acétylcholinestérase peut être expliquée par le fait que certains métaux peuvent se lier à des groupes fonctionnels de la protéine, tels que les groupes sulfhydryle (Najimi et al., 1997) et donc son activité catalytique pourrait être compromise. Ainsi, des études ont mis en évidence l'inhibition de

l'AChE par l'argent (Vrèek & Šinko, 2013; Šinko et al., 2014).

L'un des objectifs de notre étude était d'analyser un lien mécaniste possible entre AChE et le comportement natatoire. L'implication des systèmes cholinergiques dans l'activité locomotrice est bien établie chez les vertébrés (Pepeu & Giovannini, 2004). Nous suggérons que la variation de l'activité AChE peut être en quelque sorte impliquée avec les modifications de l'activité natatoire des larves. Pour cela, une analyse de corrélation a été effectuée entre l'activité AChE et les paramètres de comportement natatoire étudiés. On a remarqué que l'activité AChE est fortement corrélée avec les vitesses maximales ($r = 0,71$, $p < 0,01$). Ceci suggère que l'hypoactivité et l'hyperactivité des larves pourraient être associés à la fonction AChE. Selon des recherches antérieures (Sandahl et al., 2005; Bonansea et al., 2016), l'inhibition de l'activité AChE pourrait conduire à une paralysie de l'organisme, et induire des réponses comportementales anormales. Cela est en accord avec nos résultats où on a constaté une augmentation de l'AChE et des vitesses natatoires des larves de moules.

7.6 Conclusion

En conclusion, nos résultats montrent l'intérêt des études évaluant les réponses comportementales des organismes aquatiques en réponse à l'exposition aux polluants environnementaux. Les données de la présente étude ont montré que l'augmentation de la température et de la contamination en Cu et Ag perturbe le comportement natatoire des larves de moule ce qui pourrait compromettre leur dispersion et leur survie dans leur environnement naturelle. Une nette tendance à l'augmentation des trajectoires circulaires est observée chez les larves en condition de stress thermique ainsi que métallique. À notre connaissance, ceci est la première étude à montrer des altérations comportementales induites par la température, le cuivre et l'argent chez des larves de moules méditerranéennes.

Chapitre 8

Étude de l'hybridation entre *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* et évaluation des performances des larves des espèces pures et hybrides à différentes températures et à la contamination métallique

8.1 Introduction :

Un facteur écologique de grande importance dans la définition de la répartition des espèces est la température. La tolérance à la température pour chaque stade de vie d'un invertébré marin peut varier pour la même espèce (Mestre et al., 2009). La température accélère ou décroît le taux métabolique et affecte ainsi, la ponte, la croissance, le développement et la survie des larves (Anger, 2001; Clarke, 2003). Une température élevée de l'eau est couramment invoquée comme une cause probable de mortalité agissant en synergie avec d'autres facteurs (Mallet et al., 1990) telle que la pollution métallique.

Des études ont confirmé que le réchauffement climatique récent a induit des déplacements biogéographiques de nombreuses espèces végétales et animales vers le pôle et a entraîné une initiation plus précoce de diverses activités biologiques (Parmesan & Yohe, 2003; Root et al., 2003). Ces déplacements rapides de populations peuvent également conduire à la déstabilisation de nombreux écosystèmes en raison de la modification de la composition de la communauté (Ipcc, 2007). Un accroissement des températures de surface sans précédent laisse présager un succès accru des espèces adaptées à la chaleur et leur expansion vers le pôle. De même, les espèces adaptées au froid devraient souffrir d'un stress accru voire leur aire géographique se déplacer (Root et al., 2003; Helmuth et al., 2006; Herbert et al., 2007; Wethey et al., 2011).

Parmi les divers organismes présents dans les habitats intertidaux rocheux, les espèces sessiles comme les moules, représentent d'excellents systèmes d'étude pour étudier le stress environnemental. Les moules *Mytilus spp* sont des constituants importants des communautés marines côtières (Seed, 1992). Ce groupe contient deux espèces qui semblent occuper une série biogéographique par rapport à la température : la moule méditerranéenne d'eau chaude *M. galloprovincialis* et la moule bleue des eaux froides à tempérées *M. edulis*. En plus de leur importance écologique subtidales, *M. edulis* et *M. galloprovincialis* ont également un intérêt commercial et elles sont cultivées le long de la plupart des côtes européennes (Smaal, 2002).

La moule *M. galloprovincialis* est une espèce d'eau chaude et occupe principalement la Méditerranée et se prolonge vers le nord jusqu'à la côte de la France et le Royaume-Uni (Skibinski et al., 1983; McDonald et al., 1991; Gosling, 1992) alors que la moule *M. edulis* est une espèce occupant les régions tempérées et froides le long des côtes atlantiques européennes : de l'Europe du Nord à la frontière française / espagnole dans le golfe de Gascogne (Hilbish et al., 2012). Le chevauchement des zones de répartition de deux espèces sœurs a créé une zone hybride du Golfe de Gascogne au nord de l'Écosse, avec une alternance de populations hybrides et de populations parentales pures (Coustau et al., 1991; Bierne et al., 2003; Hilbish et al., 2012).

Les facteurs exogènes et endogènes impliqués dans la prévention de la fusion des génomes de deux espèces dépendent du cycle de vie. Chez la plupart des bivalves marins, le cycle de vie se caractérise par une phase adulte sessile, une fécondité élevée, une fertilisation externe et une dispersion larvaire étendue. Tout cela permet un flux génétique étendu qui devrait limiter l'isolement géographique et le potentiel de forte sélection dans un environnement souvent changeant. Par conséquent, il n'est peut-être pas surprenant qu'une des zones d'hybridation marine les plus connues, entre les moules *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis* sur les côtes atlantiques européennes, ait révélé une complexité inhabituelle (Hilbish et al., 2012). Cette zone présente une extension considérable, du sud-ouest de la France aux côtes écossaises (Skibinski et al., 1978, 1983; Coustau et al., 1991) et présente une structure en mosaïque dans laquelle des populations de génotypes purs alternent avec des populations hybrides (Skibinski et al., 1983).

L'hybridation n'est pas un phénomène rare chez les organismes marins (Gardner, 1997), et on trouve jusqu'à 18 % d'hybridation d'espèces dans la nature (Mallet, 2005). Cependant, les études empiriques et théoriques sur les zones hybrides se sont concentrées principalement sur les espèces terrestres (Barton & Hewitt, 1985; Harrison, 1990; Arnold, 1997).

Les études menées sur l'hybridation des deux espèces de moule jusqu'à présent ont porté sur le maintien des zones hybrides, les mécanismes et l'évolution de l'isolement reproductif et l'échange génétique entre les populations hybrides (Coustau et al., 1991; Arnold, 1992, 1997; Bierne et al., 2003; Mallet, 2005). Cependant, l'effet des facteurs environnementaux a été pour la plupart ignorée. En fait, les facteurs environnementaux sont des agents sélectifs puissants pour l'évolution des êtres vivants (MacColl, 2011), donc il n'est pas surprenant que l'hybridation entre deux espèces ayant des histoires différentes d'interactions avec les stress environnementaux puisse modifier leurs mécanismes de résistance. L'effet des conditions environnementales sur les performances larvaires est également crucial pour comprendre la dynamique des espèces qui s'hybrident. La performance des larves provenant de croisements hybrides versus les espèces pures permet d'évaluer les pressions sélectives potentielles qui pourraient favoriser ou décourager l'hybridation (Bierne et al., 2003).

Dans ce cadre, l'objectif de la présente étude a été d'étudier (en laboratoire) et de comparer la sensibilité des larves des espèces pures de moules, *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis*, ainsi que leurs hybrides produits par croisement au laboratoire face à l'augmentation de température et à la contamination métallique en utilisant le test embryo-larvaire de toxicité. Mais aussi de vérifier en laboratoire les capacités d'hybridation (fertilité, survie et développement) des deux espèces de moule.

8.2 Protocole expérimental

8.2.1 Les géniteurs

Les moules utilisées dans cette thèse sont achetées sur le marché en provenance d'Espagne pour *M. galloprovincialis* et d'Irlande pour *M. edulis*. Les moules sont achetées auprès d'un fournisseur le jour de la manip. Ces deux espèces partagent ensemble de nombreuses ressemblances morphologiques mais la taille de *Mytilus edulis* est inférieure à celle de *Mytilus galloprovincialis*. Pour s'assurer des espèces utilisées pour l'obtention des larves hybrides, une identification génétique a été réalisée.

8.2.2 Solutions de contamination

Dans le but de comparer la sensibilité des larves hybrides et pures de moules *M. edulis* aux métaux par rapport à l'espèce *M. galloprovincialis*, on a choisi de contaminer les larves des différentes espèces à la concentration efficace médiane CE50 de cuivre et d'argent ainsi que les CE25 des deux métaux (pour les appliquer en mélange) obtenu chez la moule méditerranéenne. Pour l'évaluation de l'effet toxique des métaux, les solutions mères ont été utilisées pour préparer la solution de cuivre (CE50= 17,6 µg/L), d'argent (CE50= 6,58 µg/L) et de mélange Cu-Ag (CE25 Cu= 10,83 µg/L et CE25 Ag= 3,11 µg/L) par dilution dans l'eau de mer qui a été collectée au "Banc d'Arguin" (Bassin d'Arcachon, SW de la France) puis filtrée.

8.2.3 Choc thermique et obtention des gamètes

L'induction de la ponte est réalisée par un processus de stimulation thermique des géniteurs adultes placés dans l'eau de mer de référence filtrée. Des moules matures d'élevage *M. galloprovincialis* et *M. edulis* sont placées séparément et alternativement pendant 30 minutes dans un bain d'eau froide (15 °C) puis dans un bain d'eau chaude (20 °C). Pour les moules femelles des deux espèces, les ovules sont émises sous la forme de rubans de couleur orange alors que le sperme des mâles est émis sous forme d'un jet de couleur blanche. Dès l'émission de leurs gamètes, chacun des mâles et des femelles est isolé dans un petit volume d'eau de mer filtrée (250 ml) à la température du bain ayant fait pondre l'animal. Avant de procéder à la fécondation, il s'agira de sélectionner, par vérification sous microscope, les moules ayant des gamètes en bon état, c'est-à-dire les ovocytes les plus réguliers, et ayant une forme ronde et les spermatozoïdes les plus mobiles et dense. Ensuite, la solution contenant les ovocytes est filtrée à l'aide d'un tamis de 100 µm et la solution de sperme sur tamis de 50 µm, cela permet d'éliminer les débris.

8.2.4 Fécondation

La fécondation a lieu par ajout de quelques millilitres de la solution de sperme dans la solution contenant les ovocytes. Quatre types de croisement ont été réalisés :

- Femelle *M. galloprovincialis* × Mâle *M. galloprovincialis*
- Femelle *M. edulis* × Mâle *M. edulis*
- Femelle *M. galloprovincialis* × Mâle *M. edulis*
- Femelle *M. edulis* × Mâle *M. galloprovincialis*

L'apparition d'un globule polaire signifie le succès de la fécondation. Environ 60 minutes après la fécondation, les œufs ayant subi la première division sont répartis dans des micro-plaques de 24 puits (Cellstar, GreinerBio-one) contenant les différents milieux à tester à raison de 2 ml par puits et quatre réplicats par condition étudiée. Le nombre maximal d'embryons par puits est 250 à 300 embryons. Pour obtenir un nombre suffisant de réplicats, plusieurs expériences ont été réalisées avec chacune un couple de géniteurs.

Pour le croisement *M. galloprovincialis* mâle et femelle, 9 couples étaient exploitables avec un pourcentage de laves malformées inférieur à 20 % à 18 °C. Pour les hybrides obtenus par croisement des femelles *M. galloprovincialis* et mâle *M. edulis*, 7 couples ont été utilisés. Respectivement pour les larves d'espèces pures *M. edulis* et pour les hybrides issus des femelles *M. edulis*, 7 couples ont été utilisées à 18 et 22 °C alors que seulement 4 couples ont été retenues à 20 °C.

8.2.5 Incubation :

Les embryons ont été mis en contact avec les différents produits à tester puis ont été incubées à différentes températures (18, 20, 22 et 24 °C) dans des enceintes thermo-régulées à l'obscurité pendant 48h jusqu'à atteindre le stade larve-D. Ces températures déjà testées sur les larves de la moule méditerranéenne. Après 48 h d'incubation, 25 µl de formol à 37 % est ajouté dans chaque micro-puits pour stopper le développement. L'analyse des larves malformées peut être faite immédiatement ou ultérieurement à condition que les micro-plaques soient conservées à 4 °C.

8.2.6 Analyse de développement larvaire

Le pourcentage de larves-D malformées a été déterminé pour chaque espèce par l'observation et le dénombrement directe de 100 larves sous un microscope inversé à un grossissement 400X équipé d'un appareil photo numérique et un logiciel d'acquisition d'image (Nikon, Inverted Microscope Eclips, TS 100/TS100-F, TS100LED MV/TS100 LED-F MV). Une larve est considérée bien formée seulement si elle

prend la forme d'un D, toutes les autres formes de larves seront considérées comme anormales. Dans notre analyse les différentes malformations larvaires et l'arrêt de développement ont été considérés comme des anomalies de développement.

8.2.7 Analyses statistiques

L'ensemble des données ont été traitées statistiquement à l'aide du logiciel R (<http://cran.r-project.org/>). Les résultats ont d'abord été testés pour la normalité (test de Shapiro-Wilk sur les résidus avec un risque de 1 %) et de l'égalité de la variance (test de Levene sur les résidus, risque de 5 %). L'analyse statistique a été réalisée par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Les différences entre les conditions ont ensuite été testées en utilisant le test post hoc de Kruskal (équivalent au test Tuckey HSD pour les données non paramétriques). La différence est considéré comme significative lorsque $p < 0,05$.

8.3 Résultats :

8.3.1 Variabilité interindividuelle entre les différents couples de la même espèce

Les résultats d'observation sous microscope révèlent des niveaux très élevés de fécondation (≥ 90 %) car seuls quelques ovocytes ont été observés, et 48 h après la fécondation, la plupart des embryons atteignent le stade larve-D. Pour tous les couples de géniteurs utilisés pour réaliser les bio-essais d'embryotoxicité, les résultats ont montré une variabilité inter-couples importante entre géniteurs (figures 8.3.1 ; 8.3.2 ; 8.3.3 et 8.3.4). Pour les couples de moules méditerranéennes, le pourcentage des larves malformées à 18 °C était systématiquement inférieur à 20 %. L'un des objectifs de la présente étude est l'évaluation de l'effet de l'augmentation température sur les larves de moule *M. edulis* et des hybrides. Donc même les couples donnant plus que 20 % de malformations à 18 °C ont été utilisés.

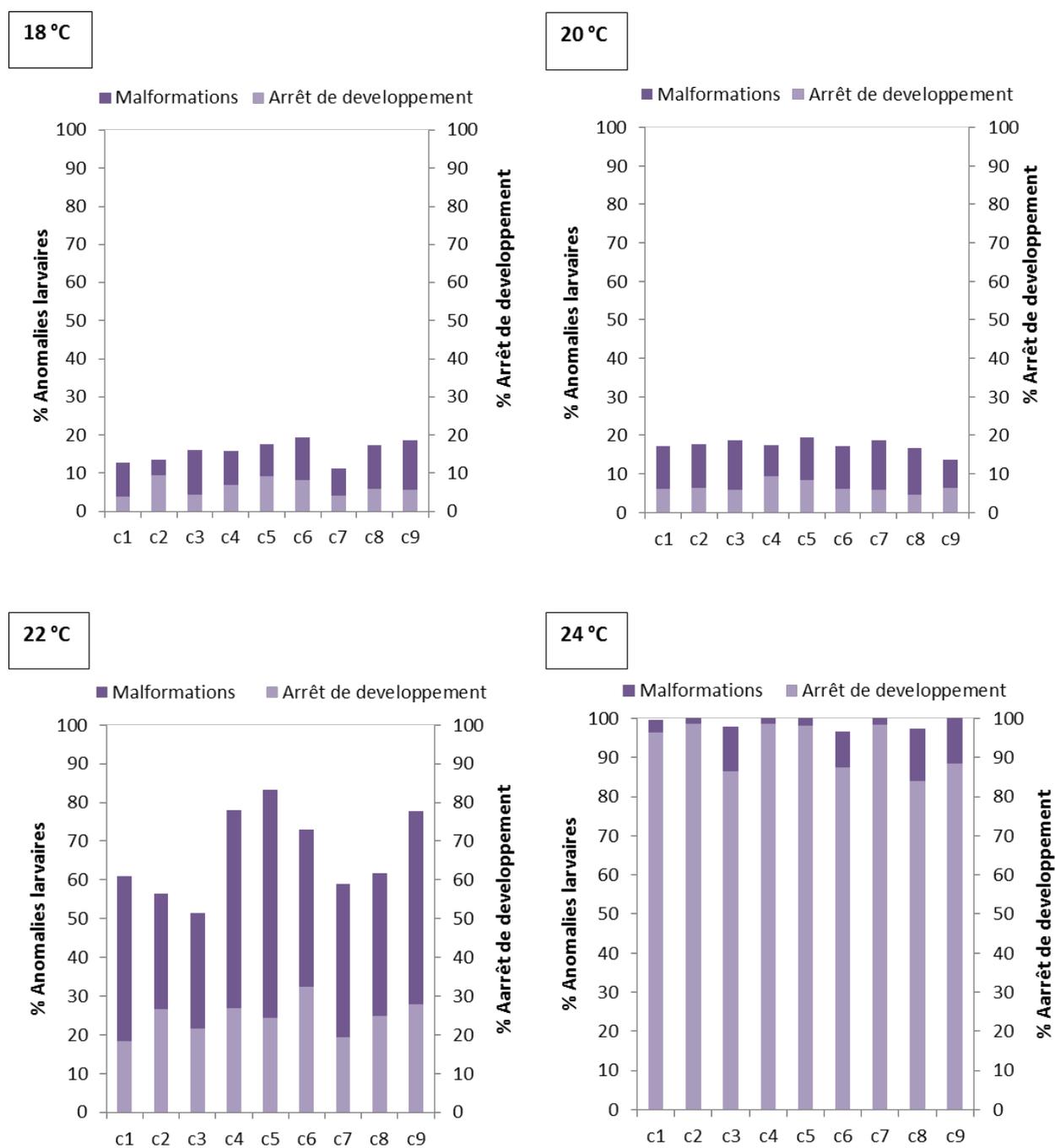


FIGURE 8.3.1 – Comparaison de la variabilité inter-couples des pourcentages de larves-D malformées de *M. galloprovincialis* exposées pendant 48h à différentes conditions de température. L'axe Y secondaire indiquant le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves en anomalies de développement.

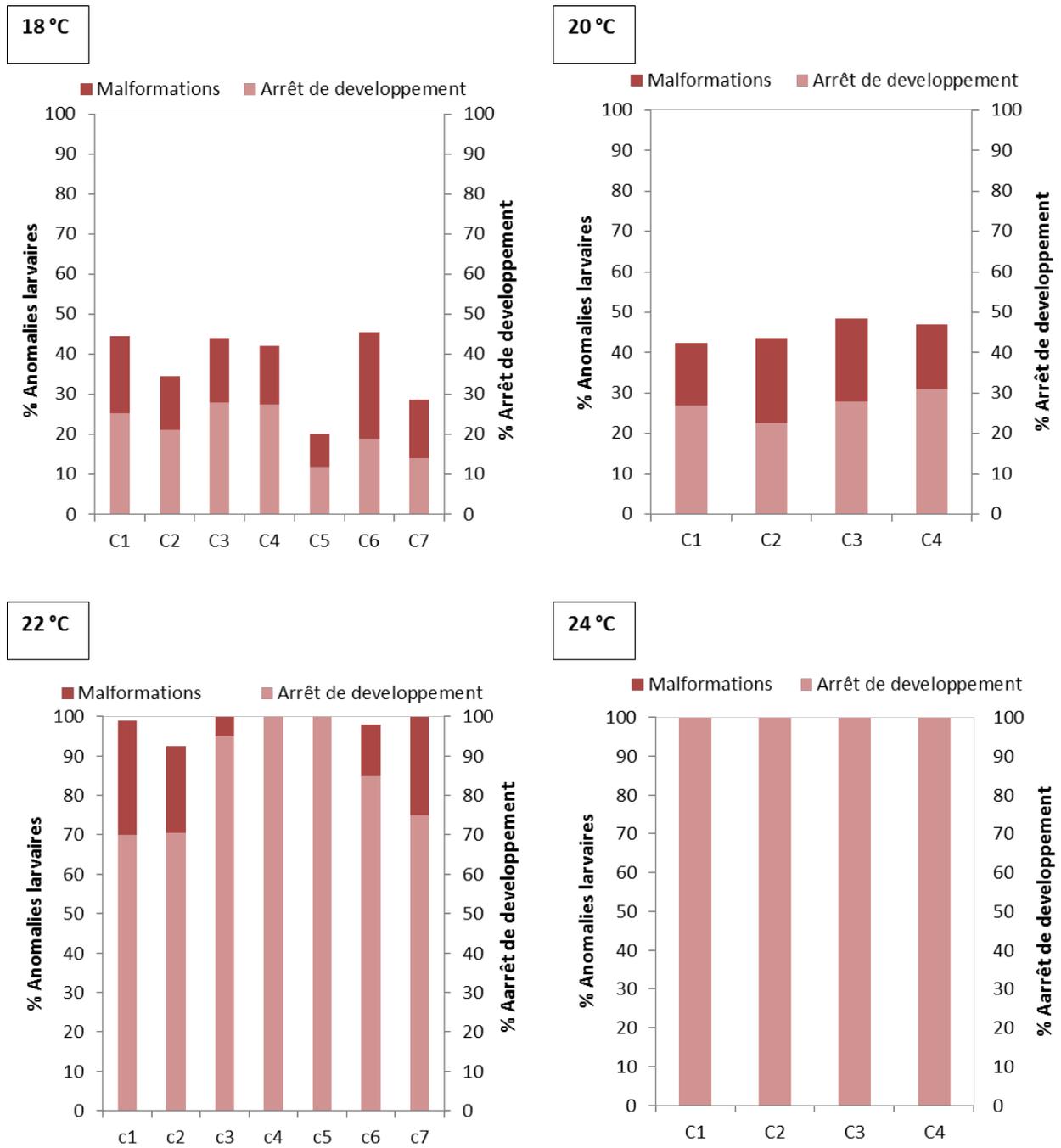


FIGURE 8.3.2 – Comparaison de la variabilité inter-couples des pourcentages de larves-D malformées de *M. edulis* exposées pendant 48 h à différentes conditions de température. L'axe Y secondaire indiquant le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves en anomalies de développement.

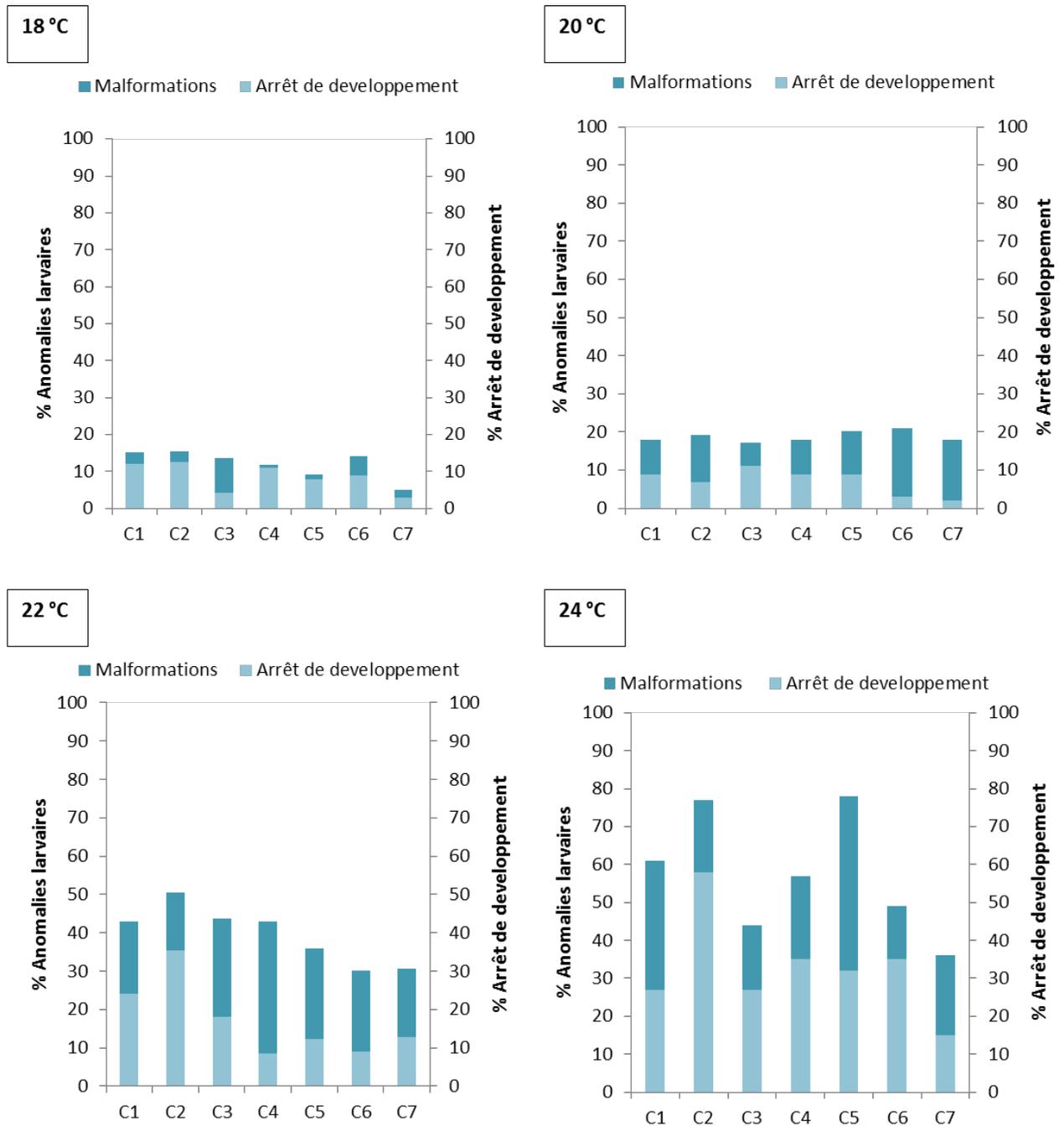


FIGURE 8.3.3 – Comparaison de la variabilité inter-couples des pourcentages de larves-D hybrides malformées (*F. Mytilus galloprovincialis* × *M. Mytilus edulis*) utilisées dans les différentes conditions de température. L'axe Y secondaire indiquant le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves en anomalies de développement.

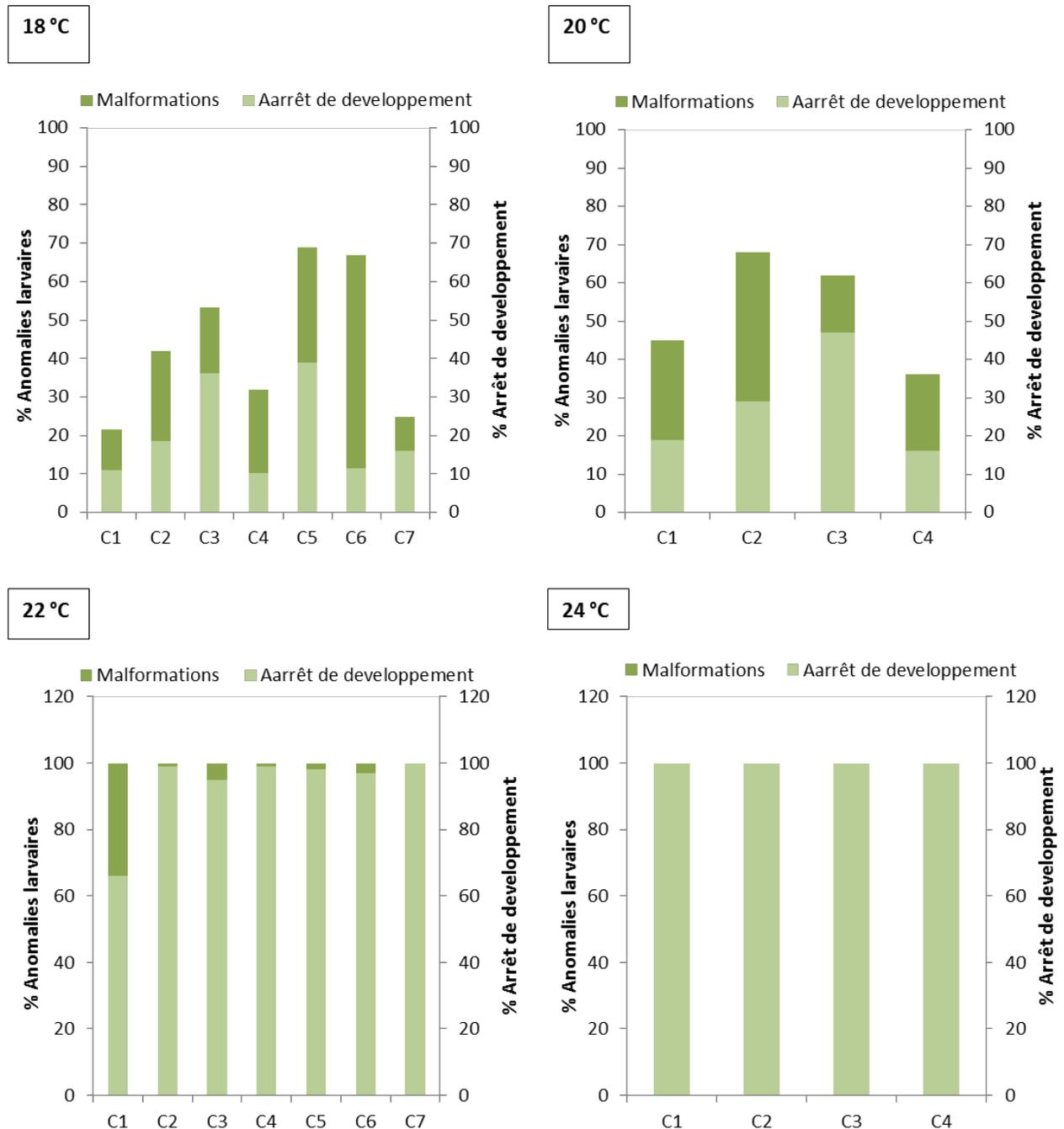


FIGURE 8.3.4 – Comparaison de la variabilité inter-couples des pourcentages de larves-D hybrides malformées (*F. Mytilus edulis* × *M. Mytilus galloprovincialis*) utilisées dans les différentes conditions de température. L'axe Y secondaire indiquant le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves en anomalies de développement.

8.3.2 Comparaison de la sensibilité des larves hybrides et de la moule bleue *M. edulis* à l'augmentation de la température par rapport aux larves de la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis*

L'embryotoxicité de la température pour les larves-D de moule a été évalué pour les 4 espèces étudiées. La sensibilité des différentes espèces de moules à l'augmentation de température a été évalué en exposant les embryons pendant 48 h (Stade larve-D) à 4 températures différentes.

L'effet d'une température 18 °C sur le développement des larves de moules est présenté dans la figure 8.3.5. Nos résultats montrent que les larves *M. edulis* sont plus sensibles à la température que les larves *M. galloprovincialis* avec respectivement un pourcentage de larves malformées égale à $37,07 \pm 9,63 \%$ et $15,8 \pm 2,73\%$. Les larves hybrides issues d'une femelle *M. galloprovincialis* sont significativement moins sensibles à température de 18 °C par rapport aux trois autres croisements avec un pourcentage de larves malformées de $12,03 \pm 3,77 \%$. Nos résultats n'ont montrés aucune différence significative entre les larves de *M. edulis* et les larves hybrides d'une femelle *M. edulis* avec un mâle *M. galloprovincialis*. En revanche, nos résultats ont mis en évidence une différence significative entre les deux types des larves hybrides avec un pourcentage de larves anormales de 12 % pour les larves obtenues d'une femelle *M.galloprovincialis* et 44 % pour les larves obtenues d'une femelle *M. edulis*.

L'effet d'une température 20 °C sur le développement des larves de moules est présenté dans la figure 8.3.6. Nos résultats montrent qu'une augmentation de deux degrés augmente le pourcentage de larves anormales de toutes les espèces par rapport à la température 18 °C. Aucune différence significative n'a été observée entre les larves *M. galloprovincialis* et les hybrides de femelle *M. galloprovincialis* et entre les larves *M. edulis* et les hybrides de femelle *M. edulis*. En revanche, il y a une différence significative de sensibilité à la température entre les larves D de *M.galloprovincialis* et *M.edulis*. Par ailleurs, il y a une différence significative entre les larves hybrides issus d'une de femelle *M. galloprovincialis* ($18,82 \pm 1,38 \%$) et celles issus d'une femelle *M. edulis* ($52,75 \pm 14,81 \%$).

L'effet d'une température 22 °C sur le développement des larves de moules est présenté dans la figure 8.3.7. Nos résultats montrent qu'une augmentation de quatre degrés provoque 100 % de malformation dont 93,42 % d'arrêt de développement chez les hybrides d'une femelle *M. edulis*. Une différence significative de sensibilité à la température a été notée entre les larves D de *M. galloprovincialis* ($66,86 \pm 11,81 \%$) et *M. edulis* ($98,5 \pm 2,7 \%$). Par ailleurs, il y a une différence significative entre les larves hybrides issus d'une de femelle *M. galloprovincialis* (39,6 %) et celles issus d'une femelle *M. edulis* (100 %).

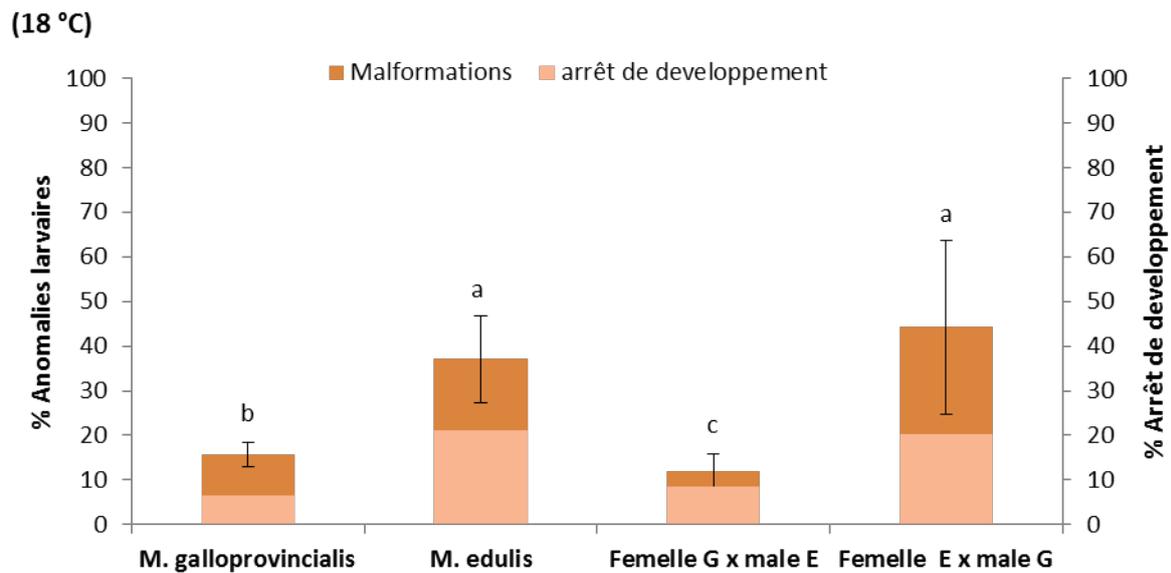


FIGURE 8.3.5 – Effet de l'incubation 48h à 18 °C sur le développement des larves-D de *M. galloprovincialis*, *M. edulis* et les hybrides des deux espèces. L'axe Y secondaire indique le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves malformées. Différentes lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$) entre les différents croisements. (Moyennes \pm écart type).

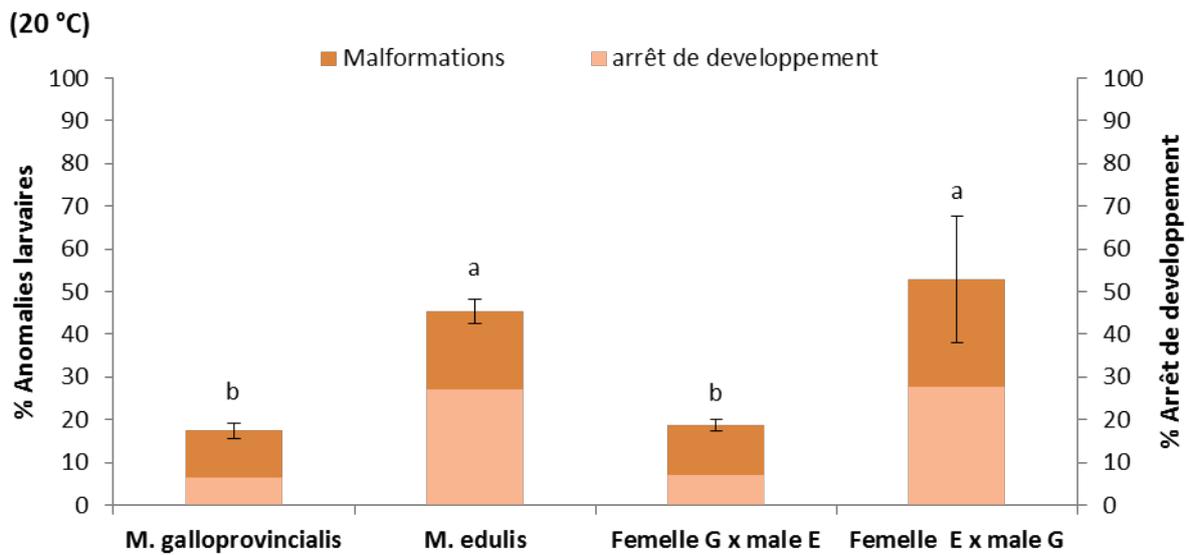


FIGURE 8.3.6 – Effet de l'incubation 48 h à 20 °C sur le développement des larves-D de *M. galloprovincialis*, *M. edulis* et les hybrides des deux espèces. L'axe Y secondaire indique le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves malformées. Différentes lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$) entre les différents croisements. (Moyennes \pm écart type).

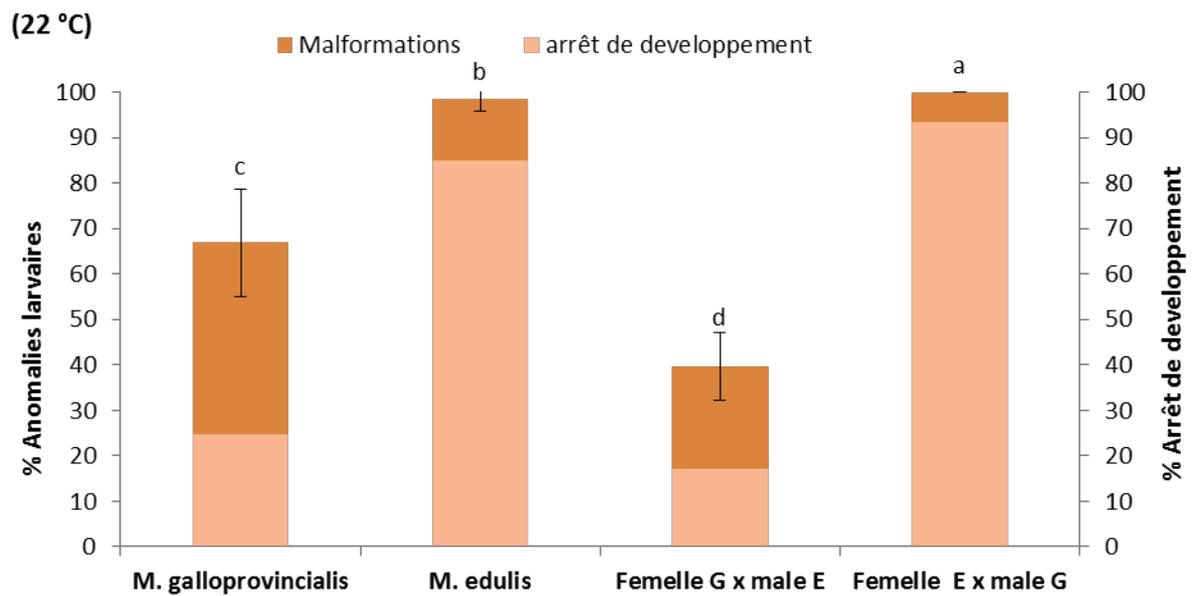


FIGURE 8.3.7 – Effet de l'incubation 48 h à 22 °C sur le développement des larves-D de *M. galloprovincialis*, *M. edulis* et les hybrides des deux espèces. L'axe Y secondaire indique le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves malformées. Différentes lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$) entre les différents croisements. (Moyennes \pm écart type).

L'effet d'une température 24 °C sur le développement des larves de moules est présenté dans la figure 8.3.8. Nos résultats montrent qu'une augmentation de six degrés augmente le pourcentage de larves anormales de toutes les espèces par rapport à la température 18 °C. Aucune différence significative n'a été observée entre les larves *M. galloprovincialis* (99 %), *M. edulis* (100 %) et les hybrides de femelle *M. edulis* (100 %). En revanche, il y a une différence significative de sensibilité à la température entre les larves-D hybrides issues d'une femelle *M. galloprovincialis* ($57,42 \pm 15,96$ %) et les trois autres espèces.

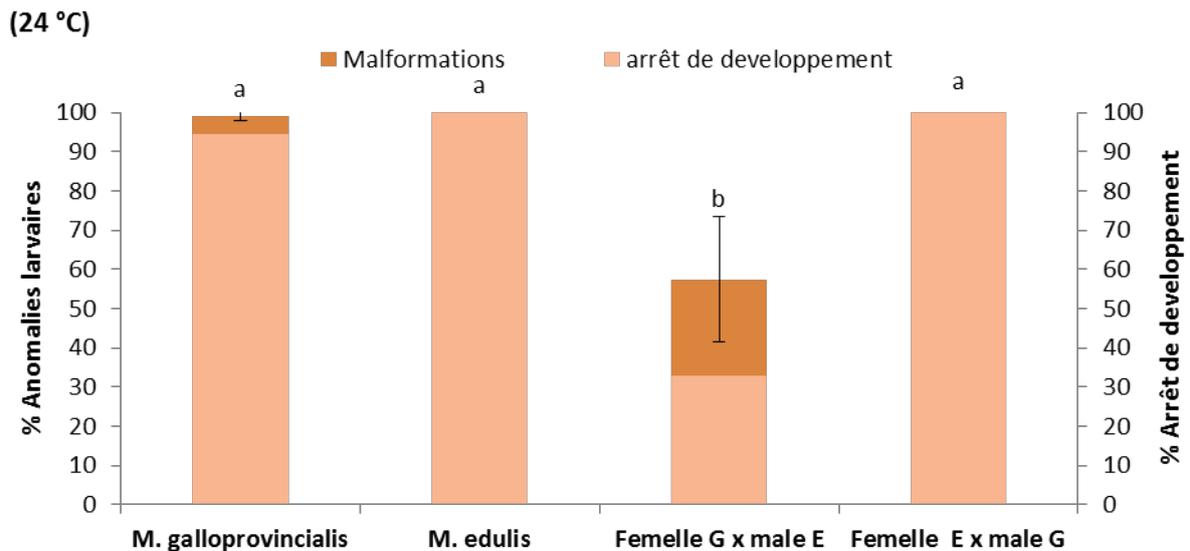


FIGURE 8.3.8 – Effet de l'incubation 48h à 24 °C sur le développement des larves-D de *M. galloprovincialis*, *M. edulis* et les hybrides des deux espèces. L'axe Y secondaire indique le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves malformées. Différentes lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$) entre les différents croisements. (Moyennes \pm écart type).

8.3.3 Comparaison de la sensibilité des larves hybrides et de moule bleue *M. edulis* aux deux métaux (Cu, Ag) par rapport aux larves de la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis*

Les effets de cuivre, de l'argent et de mélange Cu-Ag à 18 °C sur le développement larvaire des moules sont présentés dans la figure 8.3.9. Nos résultats n'ont mis

en aucune différence significative entre les larves issues des différents croisements quel que soit le métal utilisé, sauf les hybrides issues de femelle *M. galloprovincialis* exposées à l'argent. Ces dernières ont été significativement moins sensibles à l'argent par rapport aux trois autres croisements. On a remarqué aussi que chez les hybrides de femelle *M. galloprovincialis* les pourcentages de larves malformées sont globalement plus faibles par rapport aux autres croisements quel que soit le contaminant utilisé.

8.3.4 Comparaison de la sensibilité des larves hybrides et de la moule bleue *M. edulis* à l'effet combiné de la température et des métaux par rapport aux larves de la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis*

L'impact de la température sur l'embryotoxicité des métaux a été évalué chez les larves des moules et les résultats sont présentés dans la figure 8.3.10. En cas d'une co-exposition au cuivre et à une température haute de 22 °C, nos résultats ont montré une différence significative entre les larves avec un plus faible pourcentage de malformations obtenu chez les larves hybrides issues de femelle *M. galloprovincialis* $61,45 \pm 9,66$ %. Pour l'argent ou le mélange Cu-Ag, aucune différence significative n'a été montrée entre les larves *M. edulis* et les larves hybrides d'une femelle *M. edulis*. Les pourcentages de malformations chez les larves *M. edulis* et les larves hybrides issues d'une femelle *M. edulis* sont significativement plus importantes que celles chez les larves *M. galloprovincialis*. Les larves hybrides issues d'une femelle *M. galloprovincialis* présentent un pourcentage de larves malformées plus faible que celles issues de *M. galloprovincialis* mais cette différence n'est significative que pour l'exposition au Cu.

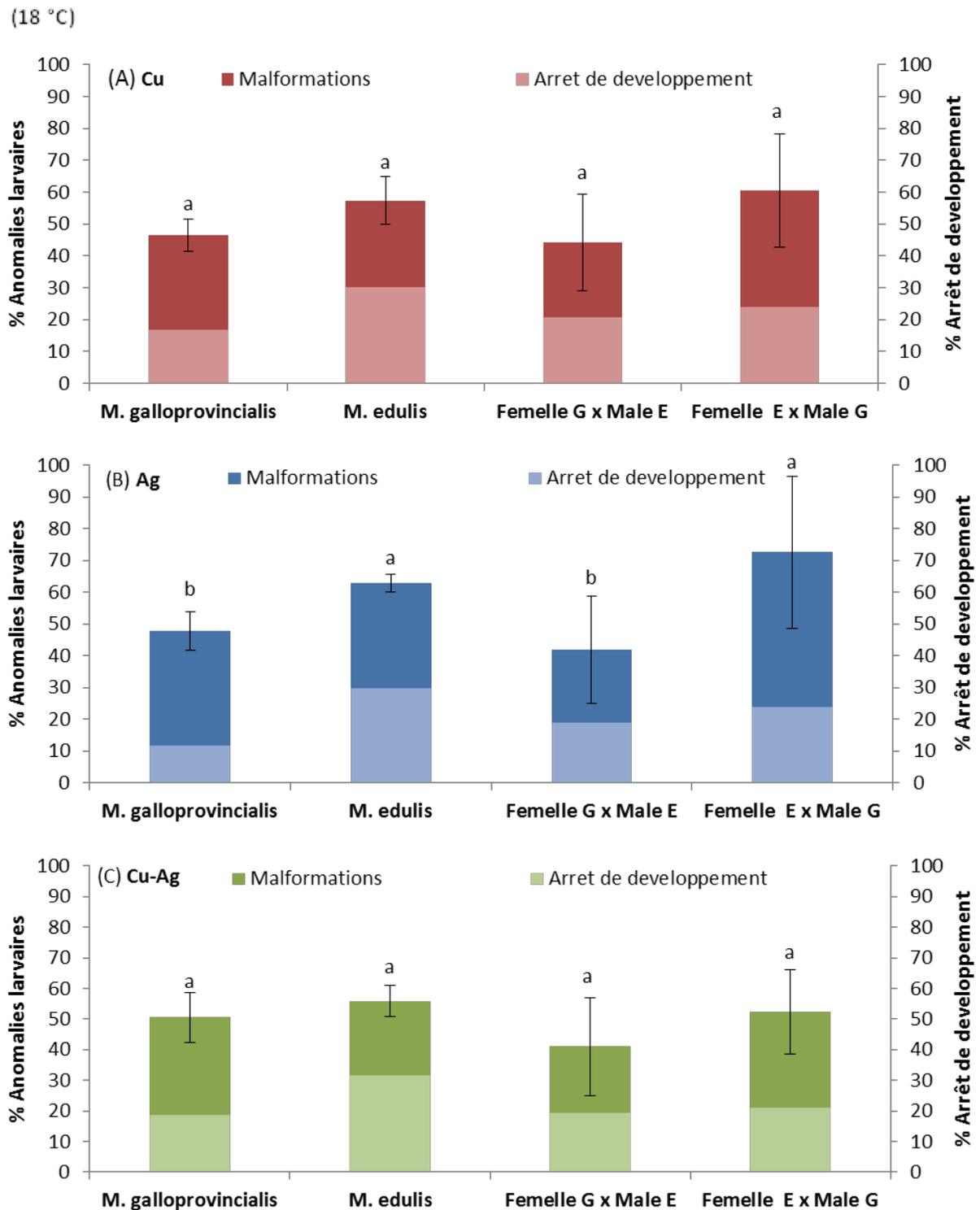


FIGURE 8.3.9 – Effet de l'exposition à une concentration de cuivre (A), d'argent (B) et le mélange (C) sur le développement des larves-D de moules *M. galloprovincialis*, *M. edulis* et les hybrides des deux espèces à 18 °C. L'axe Y secondaire indique le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves malformées. Différentes lettres indiquent des différences significatives ($p < 0,05$) entre les différents croisements. (Moyennes \pm écart type).

(22 °C)

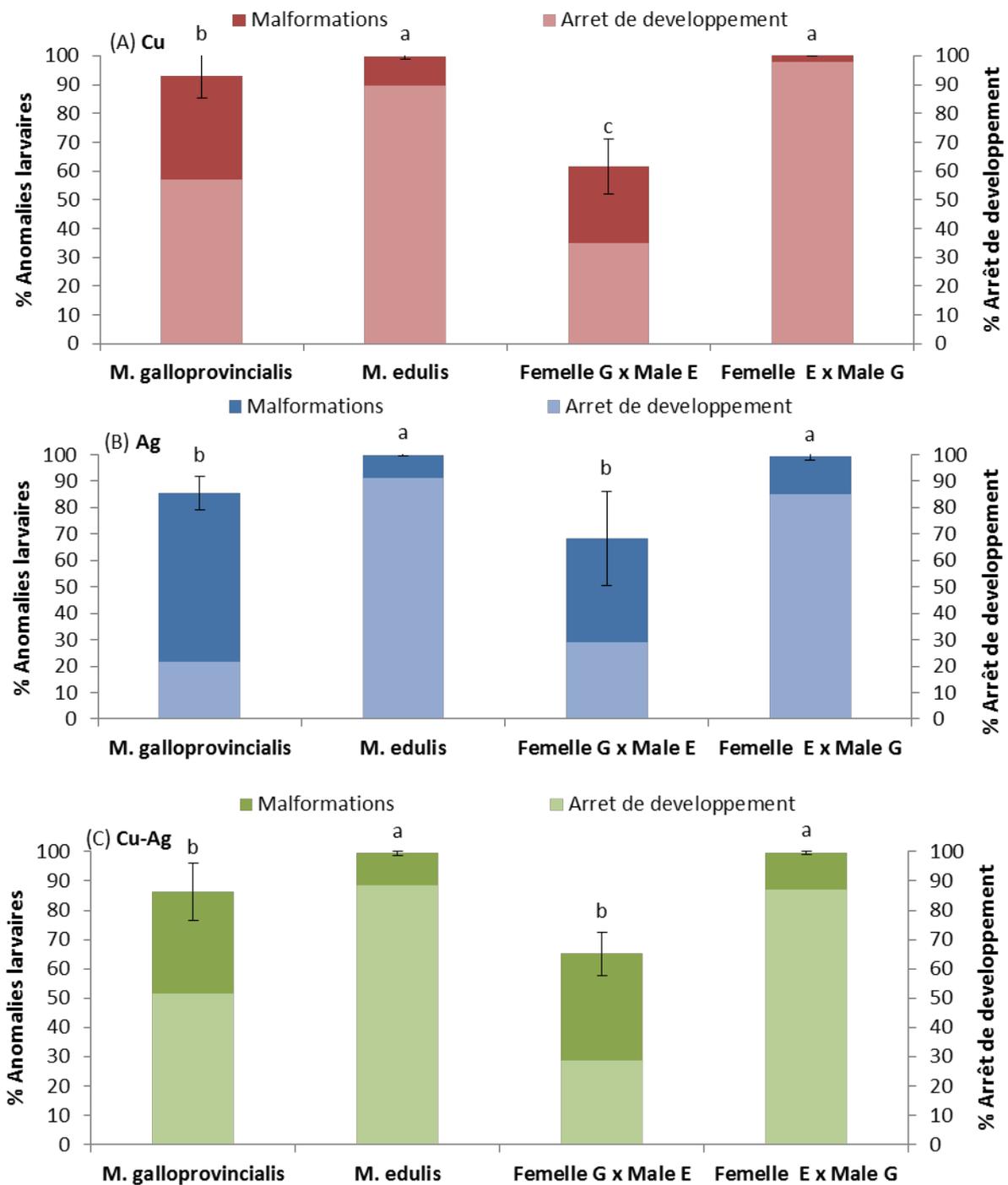


FIGURE 8.3.10 – Effet de l'exposition à une concentration de cuivre (A), d'argent (B) et le mélange (C) sur le développement des larves-D de moules *M. galloprovincialis*, *M. edulis* et les hybrides des deux espèces à 22 °C. L'axe Y secondaire indique le pourcentage des larves en arrêt de développement parmi l'ensemble des larves malformées. Différentes lettres indiquent des différences significatives (p < 0,05) entre les différents croisements. (Moyennes ± écart type).

8.4 Discussion :

Nous avons effectué pour la première fois une évaluation des effets de l'augmentation de température et de contamination métallique sur des larves hybrides de moule par croisement en laboratoire des gamètes issus de deux espèces pures : *M. galloprovincialis* et *M. edulis*. Pour cela, le test embryo-larvaire de toxicité a été utilisé pour étudier et comparer la sensibilité des larves de deux espèces pures ainsi que leurs hybrides (Femelle *M. galloprovincialis* × Mâle *M. edulis* et Femelle *M. edulis* × Mâle *M. galloprovincialis*) à l'augmentation de température et à la contamination métallique (Cu et/ou Ag).

Les résultats de la présente étude confirment que l'hybridation entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis* produit avec succès des larves qui survivent au moins 48 h après la fécondation. Ceci est cohérent avec l'hybridation très répandue observée entre ces espèces dans la nature (Skibinski et al., 1983; McDonald et al., 1991).

Nos résultats ont mis en évidence une variabilité inter-géniteurs chez les différentes espèces étudiées. La variation entre les individus est un phénomène bien connu dans l'expérimentation humaine et animale. Selon Toonen & Pawlik (2001) (p. 2450) "all larvae are not created equal". Pendant des décennies, le dogme dans l'expérimentation animale était de réduire la variabilité interindividuelle autant que possible afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs avec le moins d'animaux. Dans l'écologie comportementale, la variabilité interindividuelle est considérée comme une condition préalable à l'évolution. L'idée générale est que certains individus dans des conditions environnementales particulières ont une aptitude plus élevée que d'autres conduisant à une survie, croissance ou encore une reproduction plus élevée (Koolhaas et al., 2010). Les conditions environnementales rencontrées au cours des premiers stades de la vie, et notamment la température, ont le potentiel de causer des effets forts et irréversibles sur les phénotypes individuels et la condition physique à long terme (Burton & Metcalfe, 2014).

La présente étude a examiné l'hypothèse générale selon laquelle la survie, la croissance et le développement des larves de moules varient en fonction de l'espèce et de la température. Nos résultats confirment cette hypothèse et suggèrent que la gamme de tolérance thermique des larves de moules est espèce-spécifique.

Nos résultats montrent que les larves *M. edulis* sont plus sensibles à la température 18 °C que les larves *M. galloprovincialis*. La moule *M. galloprovincialis* est distribuée dans des eaux plus chaudes que *M. edulis*, ce qui explique que les larves de *M. galloprovincialis* se développent mieux aux températures plus élevées. Nos résultats le confirment car, dans tous les essais, les larves d'espèce pure de *M. galloprovincialis* se sont mieux développées à températures hautes. Brenko & Calabrese (1969) ont montré que la survie des larves *Mytilus edulis* était optimale à une température 10 °C et une salinité de 40 ‰ et que la croissance des larves était

plus rapide à une température de 15 °C dans des salinités de 25 à 35 ‰. Bayne (1965) a découvert que les larves de *Mytilus edulis* ont survécu à une température de 16 °C pendant 26 jours sans nourriture. Le temps de survie, cependant, peut-être plus court à des températures plus élevées. Le pourcentage de malformations augmente avec l'augmentation de la température pour les larves des deux espèces pures pour atteindre à 24 °C 99 % de malformation des larves *M. galloprovincialis* et 100 % des larves *M. edulis*. Il semble probable qu'à 24 °C, une température qui favorise la croissance bactérienne, l'effet sur la survie est le résultat combiné d'une diminution de la vitalité des larves et d'une prolifération accrue des bactéries.

Les larves hybrides issues d'une femelle *M. galloprovincialis* sont significativement moins sensibles à l'augmentation de la température par rapport à *M. galloprovincialis*, *M. edulis* et les hybrides issues d'une femelle *M. edulis*.

L'hybridation entre espèces de moule *Mytilus spp* se produit naturellement dans les endroits où leurs distributions se chevauchent (Gosling, 1992) et où dans les zones où les espèces non natives ont été introduites par des activités maritimes ou aquacoles (Bierne et al., 2003). L'ampleur de l'hybridation varie en fonction de facteurs tels que la synchronisation de frai (Toro et al., 2002), les conditions environnementales et l'adaptation locale (Riginos & Cunningham, 2005) et les activités humaines (Väinölä & Strelkov, 2011), allant de faible à des fréquences très élevées de descendants hybrides (Dias et al., 2009).

Une zone d'hybridation particulière entre *M. galloprovincialis* et *M. edulis* en « Whitsand Bay », dans le sud de la Grande-Bretagne, a fait l'objet d'une enquête de plusieurs auteurs. En utilisant une analyse par allozymes pour identifier des espèces pures et hybrides, Gardner et al. (1993) et Wilhelm & Hilbish (1998) ont montré que cette population comprend une proportion élevée de *M. edulis* récemment installés. Ces auteurs font état d'une sélection naturelle continue des individus de *M. edulis* par rapport aux hybrides ou *M. galloprovincialis*. La sélection est si forte qu'il n'y a pratiquement pas d'anciens individus de *M. edulis* dans la baie de Whitsands.

Bien que les performances larvaires face aux conditions environnementales des moules *M. edulis* par rapport *M. galloprovincialis* ont déjà été étudiées, celles des hybrides restent encore peu inconnue. Les données de cette étude ont montré qu'une température de 22 °C provoque 100 % de malformations chez les larves hybrides issues d'une femelle *M. edulis* et les larves pures de moule *M. edulis*. Une température 24 °C provoque 100 % d'arrêt de développement chez les hybrides issues d'une femelle *M. edulis*. Cependant, les données de cette étude ont montrées que les larves hybrides d'une femelle *M. galloprovincialis* sont significativement plus résistantes à température haute de 24 °C avec 57 % e larves anormales. Pour toutes les températures testées, Il y avait une différence significative entre les deux espèces hybrides. Les larves hybrides issues d'une femelle *M. edulis* sont plus

sensibles à la température.

Les moules du genre *Mytilus spp* présentent un mode inhabituel de transmission de l'ADN mitochondrial (ADNmt) (Skibinski et al., 1994; Zouros et al., 1994), appelée hérédité doublement uni-parentale. Les femelles sont homoplasmiques pour le mitotype « F » qui est hérité maternellement, alors que les mâles sont hétéroplasmiques pour le mitotype « M » hérité paternellement. Cependant, les gamètes des deux sexes sont homoplasmiques, chez les femelles pour F et chez les mâles pour M. On pense que les mitochondries du sperme pénètrent dans l'ovule à la fécondation (Longo & Anderson, 1970) et que le mitotype M est éliminé chez les larves destinées à devenir femelles entre 18 et 48 h après la fécondation (Sutherland et al., 1998).

Une étude menée par Hilbish et al. (2012) a prévu que la population de *M. edulis* dans le golfe de Gascogne disparaîtra d'ici 2050 et que toute la région sera occupée par *M. galloprovincialis* ou les moules hybrides dominée par une fréquence élevée d'allèles de *M. galloprovincialis*, comme celle observée actuellement le long des marges occidentales de l'Irlande et du Royaume-Uni (SKIBINSKI & RODERICK, 1991).

Selon les résultats de la présente étude, des hybrides issus d'une femelle *M. galloprovincialis* sont plus performants face à l'augmentation de température que des hybrides issus d'une femelle *M. edulis*. Les travaux sur des larves de moules hybrides en laboratoires sont très limités d'où la difficulté de mieux comprendre nos résultats. Un travail a été mené par Beaumont et al. (2004) sur des larves d'espèces pures de moules *M. galloprovincialis* et *M. edulis* ainsi qu'à leur hybrides croisés en laboratoires. Les résultats obtenus ont montré que des larves hybrides d'une femelle *M. edulis* incubées pendant 72 h à 14 °C présentent un pourcentage significativement plus élevé de larves normales (33,9 à 63,7 %) que celles issues d'une femelle *M. galloprovincialis* pure (25 à 51.9 %). A la même température, le pourcentage de normalité va de 39.1 à 46.6 % pour les larves hybrides d'une femelle *M. galloprovincialis*. L'hypothèse à proposer c'est que les différences significatives entre ces deux espèces face à la température est le résultat de la variation génétique entre les individus, bien que certains pourraient aussi être dus aux effets maternels. Les effets maternels peuvent prendre diverses formes allant des changements morphologiques et comportementaux induits hormonalement, au transfert de la résistance à la pollution et aux agents pathogènes, à la modification épigénétique de l'expression des gènes (Uller, 2008; Crean et al., 2013).

Bien qu'il soit déjà démontré que les changements climatiques puissent avoir des répercussions importantes sur la répartition des espèces et l'étendue des zones d'hybridation, il paraît improbable que des variables isolées soient les seuls facteurs impliqués (Helmuth et al., 2006). La combinaison de facteurs de stress peut avoir des effets antagoniste, synergique et additif (Coors & De Meester, 2008), ce qui rend

difficile les prédictions à partir des études à stress unique aux effets du changement climatique.

Les premiers stades de vie des bivalves sont particulièrement très sensibles à l'exposition aux polluants et notamment les métaux lourds (Nadella et al., 2009; Prato & Biandolino, 2010; Gamain et al., 2016a,b). Les résultats rapportés dans ce travail ont mis en évidence les effets du cuivre et de l'argent sur le développement embryon-larvaire des espèces pures de la moule *M. galloprovincialis* et *M. edulis* et leurs hybrides. Nos résultats n'ont mis en évidence aucune différence significative entre les espèces quel que soit le métal utilisé, sauf pour l'argent chez les larves hybrides issues de femelle *M. galloprovincialis*. Ces dernières sont apparues significativement plus tolérantes à l'argent par rapport aux autres espèces. On remarque que chez les hybrides issus de femelle *M. galloprovincialis*, les pourcentages de larves malformées sont globalement plus faibles par rapport aux autres espèces quel que soit le contaminant. Martin et al. (1981) ont mené une étude sur des embryons de *M. edulis* exposés à divers métaux et les résultats ont abouti à des CE50 égales à 5.8 µg/L pour $CuSO_4$ et 14 µg/L pour $AgNO_3$. Dans le cycle de vie de *Mytilus edulis*, le stade embryonnaire s'est révélé être le stade le plus sensible au cuivre (Hoare et al., 1995b). A notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur la toxicité des métaux sur les hybrides de moules.

L'effet de la température sur la sensibilité des organismes aquatiques aux polluants a déjà été documenté dans le contexte écotoxicologique (Cairns et al., 1975; Tomanek and Zuzow, 2010; Attig et al., 2014a). Toutefois, seules quelques études ont décrit les effets interactifs entre la température et les métaux à l'état de traces sur le stade de vie précoce des bivalves. Nos résultats précédents ont montré que l'élévation de la température a considérablement augmenté la toxicité des métaux testés sur les larves de *M. galloprovincialis*. Il a été démontré que chez les invertébrés comme chez les vertébrés, l'interaction température-métaux suit une courbe croissante, ainsi l'augmentation de la température tend à augmenter la toxicité des métaux sur les organismes (Cairns et al., 1975). Nos résultats ont montré une différence significative entre les espèces étudiées à 22 °C avec un plus faible pourcentage de malformations obtenu chez les hybrides issus de femelle *M. galloprovincialis*. Les pourcentages de malformations chez les larves *M. edulis* et les larves hybrides d'une femelle *M. edulis* sont significativement plus importantes que celles enregistrés chez les larves *M. galloprovincialis*. Cependant, les larves hybrides d'une femelle *M. galloprovincialis* présentent un pourcentage de larves malformées plus faible que celui de *M. galloprovincialis* mais sans différence significative. Ces résultats confirment la plus grande résistance des hybrides d'une femelle *M. galloprovincialis* à l'augmentation de température. L'hypothèse à proposer est qu'il y a une transmission par la mère via l'ovocyte d'un pool de protéines de résistance (ex : HSP) pour les hybrides issus d'une femelle *M. galloprovincialis* ce qui

pourrait conférer une plus grande résistance.

8.5 Conclusion :

Les résultats de la présente étude confirment la possibilité d'hybrider en laboratoire *M. edulis* et *M. galloprovincialis* produisant avec succès des larves hybrides survivent et croissent correctement au moins sur les 48 premières heures après fécondation. Il a été montré par ailleurs que les larves de *M. galloprovincialis*, *M. edulis* et hybrides avaient une sensibilité différente à la température. Cette sensibilité différentielle est moins marquée chez les métaux. Ces travaux ont montré une sensibilité à la température et aux métaux comme suit : Hybride issue d'une femelle *M. edulis* et d'un mâle *M. galloprovincialis* = *M. edulis* > *M. galloprovincialis* > Hybride issue d'une femelle *M. galloprovincialis* et d'un mâle *M. edulis*.

Chapitre 9

Discussion générale

L'objectif initial de la présente thèse était de « **fournir des nouvelles connaissances sur les réponses précoces des stades embryo-larvaires de moule *Mytilus spp* face au réchauffement climatique et à la pollution métallique** ». Les résultats obtenus nous ont permis d'une part de proposer des marqueurs précoces de toxicité chez les stades embryo-larvaires de moule et d'autre part de fournir des premières preuves scientifiques sur les différences de sensibilité des premiers stades de vie de moule d'espèces pures et hybrides.

Afin de répondre à l'objectif principal de notre étude, plusieurs tâches ont été abordées. D'abord, le test embryo-larvaire de toxicité sur moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* a été adapté pour évaluer les effets de l'augmentation de température et/ou de la pollution métallique sur le développement embryo-larvaire de la moule (Partie 3, chapitre 1). Ensuite, les réponses des premiers stades de vie de *Mytilus galloprovincialis* face à l'augmentation de température et à la pollution métallique ont été étudiées en abordant les aspects chimiques, moléculaires, biochimiques, phénotypiques et comportementaux des larves-D de moule (Partie 3, chapitre 2, 3 et 4). Enfin, une étude comparative de la vulnérabilité des premiers stades de vie des deux espèces de moule étudiées *M. galloprovincialis* et *M. edulis* ainsi que leurs hybrides face à la pollution métallique et à l'augmentation de la température des eaux a été conduite (Partie 3, chapitre 5).

9.1 Sensibilité des stades précoces de développement de la moule *M. galloprovincialis* à la pollution métallique et au réchauffement des eaux

Les effets délétères de l'augmentation de la température et des polluants métalliques modèles étudiés sur le développement embryo-larvaire de la moule méditerranéenne ont été évalués en utilisant le test embryo-larvaire bivalve (His et al., 1999a,b). Ce bio-essai sur embryons de moule utilisé dans le cadre de cette thèse de doctorat est un test d'écotoxicité aigüe. Les premiers stades de vie de bivalves (embryons et larves) sont parmi les organismes les plus fréquemment utilisés dans les bio-essais écotoxicologiques (AFNOR, 2009). Ils sont couramment utilisés pour déterminer les effets biologiques des polluants tels que les métaux (Beiras & His, 1995; Mai et al., 2012; Gamain et al., 2016a,b), les pesticides (Mai et al., 2012; Mottier et al., 2013; Mai et al., 2014), les herbicides ou les résidus pharmaceutiques (Di Poi et al., 2013) ainsi que pour déterminer la qualité des eaux côtières (Geffard et al., 2001b) et des sédiments (Geffard et al., 2003; Cachot et al., 2006; Poirier et al., 2007; Mamindy-Pajany et al., 2010).

L'un des principaux objectifs de notre travail de recherche était l'évaluation des impacts de l'augmentation de la température et des polluants métalliques modèles sur le développement embryo-larvaire de la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis*. Le pourcentage de malformations larvaires est un marqueur sensible qui a fréquemment répondu à l'augmentation de température et aux métaux au cours de ce travail de recherche. Les différents types de malformations observés donnent un aperçu global des dommages morphologiques possibles sur l'organisme. De plus ce bioessai offre des conditions opératoires optimales en réduisant les volumes de toxique à utiliser ainsi que le temps d'exposition qui est seulement de 48 h pour la moule à 18 °C. Les effets embryotoxiques mesurés à l'aide de ce test montrent toujours une importante variabilité interindividuelle, qui est beaucoup plus marquée entre larves issues des géniteurs différents qu'entre larves issues d'un même couple de géniteurs. Cela peut se justifier par le fait que dans des conditions environnementales particulières, la réponse des survivants dépend surtout d'une performance plus élevée de certains individus que d'autres conduisant à une reproduction plus élevée, une meilleure survie, etc... (Koolhaas et al., 2010).

Les travaux menés au cours de cette thèse sont les premiers à mettre en évidence l'impact négatif de l'augmentation de la température de l'eau sur le développement des premiers stades de vie de moule. Nos résultats indiquent que les stades précoces de développement de *M. galloprovincialis* sont très sensibles à une élévation modérée de la température de l'eau et des valeurs supérieures à 22 °C réduisent significativement le développement embryonnaire de la moule méditerranéenne. Du fait de leur développement incomplet, les stades précoces de la vie sont beaucoup plus sensibles que les adultes aux effets de la température (Byrne & Przeslawski, 2013).

Des effets sublétaux sur la performance de l'organisme se produisent probablement lorsque les larves sont exposées à des températures au-delà des limites critiques. En fait, il est bien connu que l'histoire de vie larvaire aura souvent des conséquences physiques sur les individus post-métamorphose (Pechenik, 2006). L'intervalle de tolérance aux conditions environnementales varie habituellement au cours de l'ontogenèse, les stades de développement précoces de la plupart des invertébrés présentant des gammes de tolérance plus étroites que les stades ultérieurs (Dove & Connor, 2007). Selon les espèces et le type de facteurs de stress, les stades de vie précoces présentent différentes sensibilités aux facteurs de stress. Les fourchettes de tolérance à la température tendent à s'élargir et elles sont plus ou moins différentes d'une espèce à une autre (tableau 9.1). Les résultats de l'exposition des embryons de moule juste fécondés au cuivre et à l'argent montrent des effets embryotoxiques dès les concentrations environnementales (0,5 µg/L pour le Cu et 1 µg/L pour l'Ag) qui augmentent avec l'augmentation de la concentration appliquée.

TABLE 9.1 – Gamme de tolérance thermique des premiers stades de vie de différentes espèces de bivalves.

Espèces	Stade de vie	Température °C	Références
<i>Mytilopsis leucophaeata</i>	Larve	10–30	(Verween et al., 2007)
<i>Bathymodiolus childressi</i>	Embryon	7–25	(Arellano & Young, 2011)
	Blastula	2–25	(Arellano & Young, 2011)
	Trochophore	2–25	(Arellano & Young, 2011)
<i>Mytilus trossulus</i>	Embryon	7–25	(Arellano & Young, 2011)
		4–20	(Yaroslavtseva & Sergeeva, 2006)
	Trochophore	2–25	(Arellano & Young, 2011)
		4–20	(Yaroslavtseva & Sergeeva, 2006)
		14–22	(Limbeck, 2003)
<i>Mytilus edulis</i>	Embryon	5–22	(Bayne, 1965)
		6–18	(Sprung, 1984)
		5–25	(Mestre et al., 2009)
	Véligère	5–22	(Bayne, 1965)
		6–18	(Sprung, 1984)
		5–30	(Brenko & Calabrese, 1969)
		14–22	(Limbeck, 2003)
		<20	Ce travail
<i>Crassostrea gigas</i>	Véligère	22–28	(Gamain et al., 2016a)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	véligère	18–22	Ce travail

9.1 Sensibilité des stades précoces de développement de la moule *M. galloprovincialis* à la pollution métallique et au réchauffement des eaux

Bien que le Cu soit un élément essentiel à des niveaux faibles, il s'est avéré très toxique en excès pour les organismes aquatiques (Deb & Fukushima, 2007a; Gomiero & Viarengo, 2014). La sensibilité des larves de moules obtenues dans la présente étude est similaire à celle des embryons de *Mytilus trossolus* (Fitzpatrick et al., 2008) et *Crassostrea gigas* (Mai et al., 2012; Gamain et al., 2016b). Les embryons de moule de *Mytilus galloprovincialis* sont parmi les espèces aquatiques les plus sensibles au cuivre (Tableau 9.2). Ce travail est le premier à évaluer l'embryotoxicité de l'argent ionique sur les premiers stades de vie de la moule méditerranéenne et confirme bien sa forte toxicité sur les invertébrés aquatiques. Le test embryo-larvaire nécessite de respecter deux conditions pour pouvoir valider les résultats obtenus : (1) le pourcentage de larves-D normales doit être égal ou supérieur à 80 % pour les conditions témoins (Quiniou et al., 2005), et (2) la CE50 du $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ exprimée en équivalent Cu^{2+} doit être comprise entre 6 et 16 $\mu g/L$ à 20 °C. La courbe dose-réponse pour le cuivre nous a permis de calculer une CE50 à 20 °C égale à 16,28 $\mu g/L$ (12,01 – 16,42 $\mu g/L$) qui est très proche de la gamme de validité du test. Les unités toxiques ont été calculées et les résultats obtenus montrent que le cuivre et l'argent interagissent de manière additive sur le développement embryonnaire. Nos résultats sont en accords avec ceux de Coglianesi & Martin (1981) sur le développement embryonnaire de l'huître Pacifique *Crassostrea gigas*.

TABLE 9.2 – Toxicité du Cuivre chez les larves de différents invertébrés aquatiques.

Espèces	Stade de vie	CE50 ($\mu g/L$)	LOEC	Références
<i>Paracentrotus lividus</i>	larve-D	114,7	-	(His et al., 1999b)
	Larve-48h	66,76	16	(Fernández & Beiras, 2001)
<i>Crassostrea gigas</i>	larve-D	12,5	0,1	(Mai et al., 2012)
	larve-D	5,9	-	(Gamain et al., 2016b)
	larve-D	37	-	(His et al., 1999b)
	larve-D	7,4 à 14,8		(Gamain et al., 2016a)
	larve-D	20,77		(Brooks et al., 2007)
<i>Mytilus trossolus</i>	larve-D	9,6		(Nadella et al., 2009)
<i>Mytilus edulis</i>	larve-D	5,8		(Martin et al., 1981)
<i>Diadema antillarum</i>	larve-D	11		(Bielmyer et al., 2005)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	larve-D	40 (36 ‰)	6,25	(Prato & Biandolino, 2010)
	larve-D	17,6	0,5	Ce travail

Plusieurs études ont mis en évidence l'effet de la température sur la sensibilité des organismes aquatiques aux polluants (Cairns et al., 1975; Tomanek, 2010; Banni et al., 2014a,b). Toutefois, seulement quelques études ont évalué l'effet de la température sur la toxicité des polluants sur les stades de vie précoces des bivalves (Gamain et al., 2016a). Ainsi, l'augmentation de la température tend à augmenter la toxicité des polluants sur les organismes aquatiques. Il a été mis en évidence que la limite de tolérance thermique des organismes diminue en présence de polluants chimiques (Holmstrup et al., 2010). Nos résultats ont montré une interaction de l'augmentation de la température avec les deux métaux étudiés et un effet synergique a été mis en évidence quel que soit la condition d'exposition. Nos résultats sont en accord avec de nombreuses études sur différents stades de vie des espèces aquatiques (Tableau 9.3). Cet effet synergique pourrait être médié par des effets directs de la chaleur et des métaux sur les membranes cellulaires (fluidité membranaire, ...). De plus, la chaleur cible les dommages aux protéines et aux structures cellulaires, alors que les produits chimiques visent les propriétés de la membrane et protéines cellulaires. En outre, une interaction indirecte entre les produits chimiques et la température peut résulter d'une augmentation de la solubilité des métaux dans l'eau qui peut se traduire par une augmentation de leur biodisponibilité (Sokolova & Lannig, 2008).

TABLE 9.3 – Aperçu des principales études concernant les interactions entre la température et les produits chimiques.

Espèce	Polluant	Stade de vie	Interaction	Références
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Cuivre	Larve-D	Synergique	Ce travail
	Argent			
	Cuivre+Argent			
<i>Danio rerio</i>	cadmium	embryon	Synergique	(Hallare et al., 2005)
	Nickel	embryon	Synergique	(Scheil & Köhler, 2009)
	Diazinon	embryon	Synergique	(Osterauer & Köhler, 2008)
	Cuivre	Larve	Synergique	(Dorts et al., 2016)
<i>Crassostrea gigas</i>	Cuivre	Larve-D	Synergique	(Gamain et al., 2016a)
<i>Dreissena polymorpha</i>	Cuivre	Adulte	Synergique	(Prasada Rao & Khan, 2000)
<i>Gammarus pulex</i>	Cuivre	Adulte	Synergique	(Bat et al., 2000)
<i>Pimephales promelas</i>	Cuivre	Adulte	Synergique	(Lapointe et al., 2011)
<i>Idotea baltica</i>	cadmium	Adulte	Synergique	(Jones, 1975)
	Zinc	Adulte	Synergique	
	Plomb	Adulte	Synergique	
	Mercure	Adulte	Synergique	
<i>Rhithropanopeus harrisi</i>	cadmium	Larve	Synergique	(Rosenberg & Costlow, 1976)

Les données d'embryotoxicité obtenues dans la présente étude ont démontré la sensibilité des premiers stades de vie de la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis* à l'accroissement de la température de l'eau et à la pollution métallique. Afin de mieux comprendre l'implication de la température et des métaux dans la survenue des altérations embryo-larvaires, il était pertinent d'étudier les réponses biologiques au niveau moléculaire et biochimique.

9.2 Larves de moule en multi-stress : Mécanismes de réponse aux stress chimique et thermique

Une approche multi-biomarqueurs a été conduite dans le cadre de cette thèse pour l'évaluation des effets biologiques des polluants sur les premiers stades de vie de la moule méditerranéenne. La méthodologie adoptée est une démarche intégrée associant analyses chimiques, moléculaires, biochimiques et comportementales qui avait pour premier objectif d'étudier les réponses précoces des larves de moules en lien avec les variations de température, des marqueurs physiologiques et des concentrations de contaminants (Cu, Ag) bioaccumulés. Une exposition à des métaux modèles seuls ou en combinaison et à un gradient de température a été menée pour acquérir des connaissances sur la sensibilité des premiers stades de vie et pour proposer des biomarqueurs précoces pertinents permettant une caractérisation des effets combinés de la pollution thermique et métallique.

Dans cette étude, l'évaluation du niveau de bioaccumulation des métaux étudiés a clairement montré différents degrés d'accumulation dans les tissus des stades embryo-larvaires des moules pour les différentes conditions expérimentales. Nos résultats montrent une tendance à l'augmentation des niveaux de Cu et Ag bioaccumulés avec l'accroissement de la température lors des expositions aux composés simples. L'augmentation des concentrations en métaux est plus efficace à 20 ° C. Plusieurs études suggèrent que l'accumulation de métal dans les mollusques est dose et temps dépendant (Negri et al., 2013; Attig et al., 2014a). En revanche, les résultats obtenus ont montré une tendance à la diminution des niveaux de Cu et Ag bioaccumulés avec l'accroissement de la température lors de l'exposition au mélange des deux métaux. L'hypothèse qui peut être avancée serait qu'il s'agit d'une stratégie visant à réduire l'effet négatif de l'accumulation des métaux à des températures élevées ou simplement d'un effet négatif de la température sur le taux de filtration des larves de moules.

Le réchauffement climatique est un facteur majeur qui peut affecter les organismes aquatiques, en particulier dans les zones marines côtières particulièrement exposées à la pollution anthropique. L'exposition combinée à un stress métallique et thermique a affecté les activités antioxydantes de la CAT, de la SOD et de

la GST. Globalement, l'augmentation des activités enzymatiques anti-oxydantes a été enregistrée pour les températures les plus élevées. Cependant, aucun accroissement du niveau de lipopéroxydation n'a été enregistré quelles que soient les conditions expérimentales considérées. En revanche, il a été observé une augmentation significative de l'accumulation des Mts dans les larves-D de moules exposées aux métaux et au stress thermique.

Il est bien connu que les stress thermique et métallique peuvent provoquer des désordres physiologiques chez les animaux, ce qui affecte directement le métabolisme, entraînant l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (Abele et al., 2002; Pytharopoulou et al., 2011b; Gomes et al., 2011a,b; Negri et al., 2013). La vulnérabilité des stades précoces de vie des invertébrés marins aux facteurs de stress environnementaux tels que les métaux lourds a déjà été rapportée (Ringwood, 1991; His et al., 1999b) de même que l'activation des systèmes de défense antioxydant, enzymatique et non enzymatique, chez les moules (Attig et al., 2014a).

Une analyse par qRT-PCR de l'expression de gènes impliqués dans un large panel de mécanismes biologiques a été réalisée au cours de cette thèse. Cette technique s'est avérée très sensible pour détecter des variations de profils d'expression génique aux deux types de stress étudiés métallique et thermique. Néanmoins, les données de cette étude ont permis de mettre en évidence certaines cibles moléculaires impactées par le Cu et/ou l'Ag. La transcription précoce des gènes impliqués dans le système antioxydant enzymatique après exposition aux métaux et au stress thermique a été démontrée chez les larves-D de moules âgées de 48 h. L'induction significative des gènes des métallothionéines chez les larves exposées aux métaux et/ou à l'augmentation de température pourrait être une conséquence de l'augmentation des concentrations intracellulaires des métaux et des EROs (Viarengo et al., 1999; Dondero et al., 2005).

Le test des comètes a été utilisé pour évaluer le potentiel génotoxique des contaminants métalliques et de la température. Ce test dans ses deux versions, classique pour la détection des cassures des brins d'ADN et modifié (traitement préalable des cellules à la fpg) pour la détection des dommages oxydatifs de l'ADN, s'est avéré pertinent pour la mise en évidence des marqueurs de génotoxicité. Toutefois, ce test ne permet pas la mise en évidence de certains dommages de l'ADN comme la formation d'adduits à l'ADN ou de pontages intra ou inter-brins. Cette étude a montré que l'augmentation de température induisait essentiellement des altérations oxydatives de l'ADN et peu de cassures des brins d'ADN. Une hypothèse serait que les cassures des brins de l'ADN seraient prises en charge par les mécanismes de réparation de l'ADN. La surexpression des gènes p53, de la dna-ligase et de la topoisomérase en cas de stress thermique, soutiennent l'idée de la mise en place dans la cellule d'une stratégie de défense contre le stress thermique. La p53 est bien connue pour stimuler les mécanismes de réparation de l'ADN par

excision-resynthèse (Zhou et al., 2001). Bien que le nombre d'études sur les effets de la température sur les organismes marins ait augmenté ces dernières décennies, les données de la littérature concernant les effets génotoxiques induits par la température sur les organismes aquatiques sont très limitées. Chez les organismes ectothermes, les variations de température peuvent entraîner un stress oxydatif (Regoli et al., 2011). Ce dernier peut endommager les macromolécules cellulaires (lipides, protéines et ADN). Les dommages oxydatifs à l'ADN sont des lésions majeures qui peuvent conduire à une altération de la fonction cellulaire ou même à l'apoptose si ces lésions ne sont pas réparées et s'accumulent dans la cellule (Regoli & Giuliani, 2014). Nos résultats montrent que l'exposition aux métaux individuels ou en mélange produit des cassures de l'ADN. Ces effets génotoxiques sont plus marqués pour les métaux en mélange. De même une augmentation significative des altérations oxydatives a été observée chez les larves de moules exposées au métal seul ou en mélange. Les effets oxydatifs des métaux peuvent s'expliquer pour une accumulation de ceux-ci dans les mitochondries et une perturbation de la chaîne respiratoire résultant en la production de radicaux libres (Aktepe et al., 2014). En ce qui concerne l'expression des gènes d'intérêt suite à une contamination métallique, nos résultats montrent que lors d'une contamination au métal seul, l'organisme poursuit sa stratégie de défense et induit l'expression des gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, tels que l'ADN ligase et la topoisomérase (Montecucco et al., 1992; Mohanty et al., 2008). Cependant, les dommages peuvent submerger les mécanismes de réparation de l'ADN chez les larves exposées au mélange des deux métaux ce qui pourrait expliquer l'augmentation significative des altérations à l'ADN pour cette condition. De même chez les larves subissant à la fois un stress thermique et métallique, on a constaté la répression des gènes de réparation de l'ADN et la surexpression significative du gène pro-apoptotique caspase 3 et du gène p53.

Les paramètres comportementaux des organismes aquatiques sont de plus en plus considérés comme étant des indicateurs sensibles et précoces de toxicité chez les organismes aquatiques (Cairns & Gruber, 1980; Kramer et al., 1989; Diamond et al., 1990; Van der Schalie et al., 2001). Cependant, l'utilisation du comportement natatoire larvaire comme critère de toxicité pour l'analyse de risque environnemental ou pour le contrôle de la qualité de l'eau reste encore très limitée. Dans le cadre de cette thèse, un plugin et une macro ont été développés pour le logiciel Image-J qui a été utilisé pour l'analyse et la caractérisation du comportement natatoire des larves-D de moule exposées à différents stress métalliques et thermiques.

Ces outils d'analyse se sont avérés opérationnels et efficaces pour étudier l'activité natatoire des larves-D de moules. Bien que l'espèce *M. galloprovincialis* soit très étudiée, le processus natatoire des stades larvaires, élément clé pour trouver un substrat de fixation convenable et assurer la dispersion de l'espèce, est encore

largement méconnu. Les résultats obtenus au cours de cette étude nous ont permis de distinguer trois types de trajectoires des larves de moule : rectiligne, circulaire ou surplace. A 18 °C, les larves-D de moule suivent principalement un mouvement rectiligne (88 %) avec une vitesse maximale de $0,59 \pm 0,057$ mm/s et une vitesse moyenne de $0,4 \pm 0,055$ mm/s. De plus on a pu constater qu'avec l'augmentation de température, en présence ou absence des métaux, les trajectoires ont tendance à être plus circulaires ou sur place et les vitesses de nage augmentent. Nos résultats suggèrent un effet plus marqué du cuivre par rapport à l'argent sur le comportement natatoire des larves de moules. Cette hypothèse est appuyée par le fait que les trajectoires circulaires sont significativement augmentées mais seulement chez les larves exposées au Cu par rapport à la condition contrôle.

Le comportement natatoire est la résultante d'un grand nombre de processus biochimiques, physiologiques et essentiellement nerveux (Peakall, 1992). L'acétylcholinestérase joue un rôle important dans la transmission de l'influx nerveux et elle est très sensible aux changements des paramètres biotiques et abiotiques du milieu (Greco et al., 2011; Dimitriadis et al., 2012). Nos résultats montrent que l'exposition à un gradient croissant de température a significativement ($p < 0.05$) stimulé l'activité AChE chez les larves de moule. En revanche, la contamination métallique a significativement inhibé cette activité. Plusieurs études ont démontré l'altération de l'activité AChE par différents polluants tels que les métaux (Olson & Christensen, 1980; Devi & Fingerman, 1995; Frasco et al., 2005). Dans notre étude le lien mécanistique probable entre l'activité AChE et le comportement natatoire a été mis en évidence par une analyse de corrélation. On a constaté une corrélation positive entre l'augmentation de l'activité AChE et l'augmentation des vitesses natatoires des larves de moules. Rudragouda et al. (2009) ont mis en évidence que l'hypoactivité et l'hyperactivité peuvent être toutes deux associées à l'activité AChE.

L'ensemble des biomarqueurs évalués dans le cadre de cette thèse a été appliqué à la caractérisation des effets et des modes d'action des situations de stress thermique et de contamination métallique, en particulier avec le cuivre et l'argent (Figure 9.2.1). Le Cu et l'Ag ont tous deux montré une toxicité chez les stades larvaires de moule avec un effet plus marqué avec l'Ag. Les principaux effets se sont traduits par l'apparition de malformations larvaires ainsi que l'induction de stress oxydatif et de dommages à l'ADN. La toxicité de l'Ag a été noté dans ce travail à partir de 1 µg/L qui est globalement une concentration supérieure aux concentrations environnementales (Howe & Dobson, 2002). Afin d'avoir une idée sur les concentrations en Ag dans les eaux côtières tunisiennes, une analyse a été faite sur des prélèvements d'eau des côtes de Bizerte. Des valeurs de 0,34 µg/L dans un site pollué (port de pêche) et une valeur $< 0,3$ µg/L (à la limite de détection) dans un site plus au large peu pollué. La LOEC du Cu établie au cours de la présente

étude est proche voire inférieure aux concentrations environnementales (Willis & Bishop, 2016). Les analyses des eaux de Bizerte ont révélé des concentrations de 20,4 µg/L dans le site pollué (Port de pêche) et une concentration 1,22 µg/L dans un site peu pollué.

9.3 Modifications adaptatives chez la moule *Mytilus spp* en réponse au réchauffement climatique

Les projections du réchauffement au cours du siècle prochain et de ses effets sur les organismes marins et les écosystèmes sont inquiétantes (Doney et al., 2008; Pörtner, 2008; Kroeker et al., 2010; Gazeau et al., 2013). La capacité de résister à des changements aigus est fondamental pour la survie des organismes et dépend de leur niveau de tolérance. Les changements environnementaux actuels peuvent être trop rapides pour que les individus les tolèrent (Ridgwell & Schmidt, 2010), entraînant une mortalité massive et des changements dramatiques dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes (Guinotte & Fabry, 2008; Doney, 2010; Riebesell & Gattuso, 2014).

Avec l'accroissement grandissant des préoccupations concernant le changement climatique, l'impact du réchauffement des océans sur le développement ont été étudiés chez différentes espèces (Allen & Pechenik, 2010; Pechenik & Tyrell, 2015). Les moules *Mytilus spp* sont des constituants importants des communautés marines côtières (Gray et al., 1997) et elles constituent d'excellents modèles d'étude pour examiner les effets des stress environnementaux. Ce groupe contient deux espèces qui sont cultivées le long de la plupart des côtes européennes : la moule méditerranéenne des eaux chaudes, *M. galloprovincialis* et la moule bleue des eaux froides à tempérées, *M. edulis* (Smaal, 2002). L'hybridation entre les deux espèces de moule *Mytilus spp* se produit naturellement dans les zones marines côtières où leurs distributions se chevauchent (Gosling, 1992). Une zone d'hybridation entre *M. galloprovincialis* et *M. edulis* a été identifiée en plusieurs points des côtes atlantiques européennes (Skibinski et al., 1978, 1983; Coustau et al., 1991) et notamment au niveau du golfe de Gascogne (Bierne et al., 2003).

Les résultats de la présente étude confirment que l'hybridation entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis* produit avec succès des larves-D qui survivent après la fécondation. L'hypothèse évaluée dans le cadre de cette thèse est que la survie, la croissance et le développement des larves de moules varient en fonction de l'espèce et de la température. Nos résultats confirment cette hypothèse et suggèrent que la gamme de tolérance thermique des larves de moules est espèce-spécifique. Nos résultats montrent, dans tous les essais, que les larves de l'espèce *M. galloprovincialis* sont mieux adaptées à des températures chaudes en comparaison à *M. edulis*.

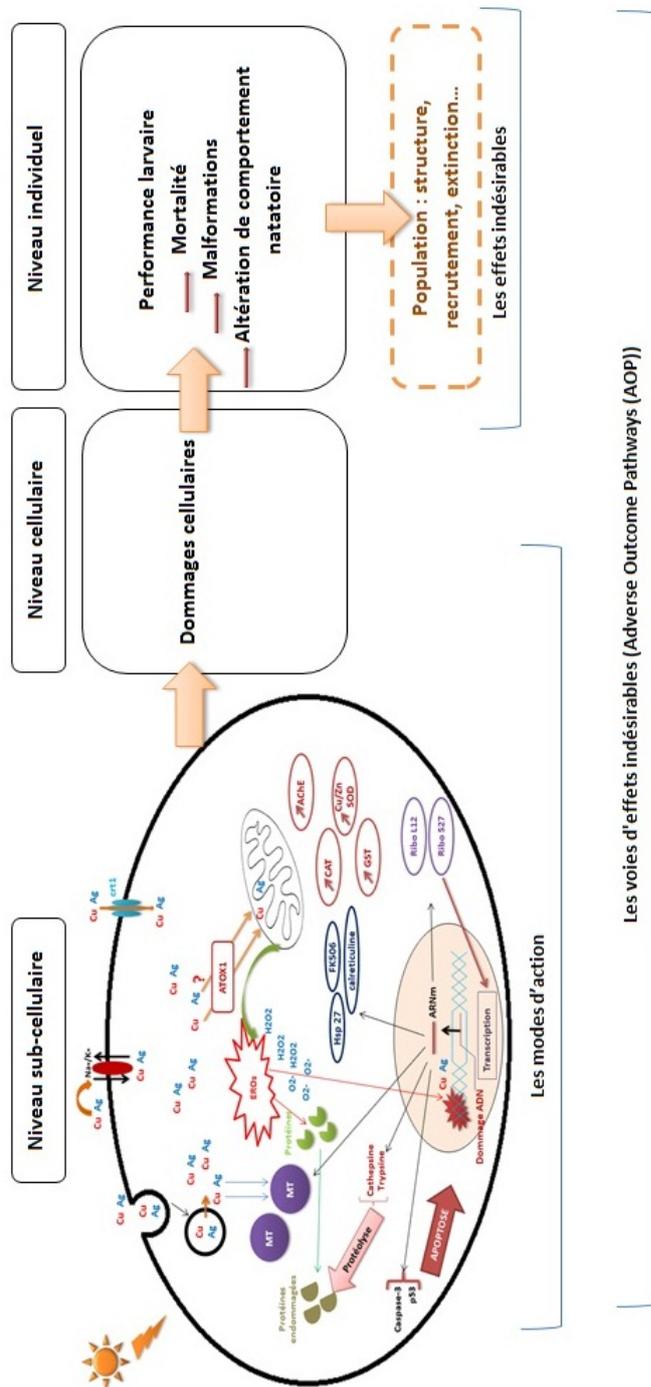


FIGURE 9.2.1 – Les voies d'effets indésirables potentiellement induites lors d'une contamination métallique au cuivre et à l'argent et d'un stress thermique chez les premiers stades de vie de la moule méditerranéenne.

Il apparaît que plus on se rapproche des limites de tolérance de l'espèce plus sa survie et son développement sont altérés. Les espèces vivant dans les estuaires font face à un environnement physico-chimique naturellement très variable et souvent proche de leurs limites de tolérance physiologique (Attrill & Rundle, 2002). Les changements climatiques projetés par le GIEC (IPCC, 2014) pourraient avoir des impacts encore bien plus importants sur les espèces estuariennes et leurs écosystèmes. Il semble que les températures élevées favorisent la croissance bactérienne ce qui peut affecter le développement et la survie larvaire. Les espèces envahissantes dans les estuaires ont augmenté au cours des 20 dernières années, en raison notamment du réchauffement de la température mondiale (Austin et al., 2010) et de l'accroissement du commerce mondial. Les problèmes associés aux espèces envahissantes, en particulier aux agents pathogènes, devraient augmenter au cours des prochaines décennies (Hoegh-Guldberg & Bruno, 2010).

Les larves hybrides issues d'une femelle *M. galloprovincialis* sont significativement moins sensibles aux basses températures (18 °C) par rapport aux trois autres espèces avec un pourcentage de larves malformées de $12,03 \pm 3,77\%$. Les données de cette étude ont montré que les larves hybrides issues d'une femelle *M. galloprovincialis* sont significativement moins sensibles à l'augmentation de température. Pour toutes les températures testées, il y avait une différence significative entre les deux espèces hybrides. Les organismes possèdent un ensemble diversifié de réponses adaptatives pour répondre aux températures extrêmes, qui peuvent agir sur des échelles de temps différentes, allant de l'ajustement phénotypique rapide à l'adaptation évolutive à long terme (Fischer & Karl, 2010). Sur un court laps de temps, les ectothermes ont la capacité d'améliorer leur thermo-tolérance lorsqu'ils sont exposés à une température sub-létale (Chown & Nicolson, 2004; Angilletta, Jr. et al., 2010). Le changement climatique oblige les espèces à modifier leur répartition géographique pour suivre leur niche climatique à mesure qu'elle se déplace d'un endroit à un autre (Chen et al., 2011). Certaines espèces ne pourront pas modifier leur répartition géographique, soit parce qu'elles ont des capacités réduites de dispersion et de colonisation de nouveaux milieux soit du fait de l'existence de barrières naturelles ou humaines infranchissables (Loarie et al., 2009). Ces espèces sont alors confrontées à la menace d'extinction (MALCOLM et al., 2006). Cependant, les réponses de nombreuses populations sont susceptibles d'être insuffisantes pour contrer la vitesse et l'ampleur du changement climatique, conduisant au déclin ou à l'extinction des espèces les plus vulnérables. L'extinction peut être évitée si les populations se déplacent vers des habitats favorables ou les organismes en raison de leur plasticité phénotypique réussissent à surmonter les conditions stressantes (Williams et al., 2008). Il est probable que les multiples facteurs de stress agiront sur des organismes estuariens de manière synergique (Dolbeth et al., 2011; Przeslawski et al., 2015). Comme conséquence du réchauf-

fement climatique, la température peut modifier la sensibilité à d'autres facteurs de stress environnementaux (pH, salinité, . . .), mais aussi la sensibilité thermique peut être modulée par l'exposition à une multitude de facteurs de stress (Sokolova & Pörtner, 2007) notamment les métaux, les pesticides, etc. Dans l'ensemble, une évaluation de l'impact des changements dans les estuaires et les zones littorales exigera une compréhension intégrée des changements des variables environnementales telles que la salinité et la température.

Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse de doctorat apporte de nouvelles connaissances quant aux réponses mises en jeu chez les stades de vie précoces de moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* face à des conditions de stress variées (métaux, température). La compréhension de la toxicité au niveau moléculaire des polluants utilisés, révèle que les cibles affectées diffèrent selon la substance chimique étudiée et les conditions de température exercées. Nos travaux de recherche apportent des données originales sur l'embryotoxicité de contaminants métalliques modèles en association avec l'augmentation de la température chez la moule : perturbation des paramètres comportementaux et morphologiques au cours du développement embryo-larvaire, activation des systèmes de défense oxydatif et marqueurs d'altération de l'ADN. Cette thèse de doctorat fournit pour la première fois des données sur la sensibilité des premiers stades de vie des espèces *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis*, ainsi que leurs hybrides face à l'augmentation de température et à la contamination métallique en utilisant le test embryo-larvaire de toxicité.

Le premier objectif de cette étude était l'évaluation des impacts de l'augmentation de la température et la compréhension de la toxicité des polluants métalliques sur le développement embryo-larvaire de la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis*. Nos résultats indiquent que, dans nos conditions de laboratoire, les stades précoces de développement de *M. galloprovincialis* sont très sensibles à une élévation de 4 °C de la température de l'eau par rapport au contrôle. L'embryotoxicité des métaux a été montrée dès les plus faibles concentrations testées et elle s'accroît de façon dose-dépendante. Nous avons mis en évidence une toxicité plus importante de l'argent sur les larves-D de moule. L'augmentation de la température tend à augmenter la toxicité des métaux, à affecter les limites de tolérance et à nuire au développement et à la reproduction de *M. galloprovincialis*. Toutefois, les polluants sont présents dans les milieux aquatiques sous forme de mélanges complexes et ces mélanges peuvent s'avérer toxiques même si les composés peuvent ne pas être toxiques aux concentrations environnementales lorsqu'ils sont considérés individuellement. Bien que les scientifiques aient généralement une bonne connaissance de la toxicité des polluants chimiques individuels, il existe encore trop peu d'information sur les effets de l'exposition à des mélanges de ces produits chimiques.

Dans ce contexte, une perspective de notre travail serait de faire une sélection des principaux polluants à risque (métaux, pesticides. . .) et d'étudier l'effet cocktail de ceux-ci sur le développement embryo-larvaire de la moule.

Le deuxième objectif de la thèse était la caractérisation des réponses adaptatives et/ou toxiques au niveau biochimique, intégrité de l'ADN et transcriptomique chez les stades embryo-larvaires de la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis* exposés à des concentrations sub-létales de cuivre et/ou d'argent et à un gradient croissant de température. Les résultats obtenus démontrent l'activation des systèmes de défense chez les larves exposées au stress thermique et métallique. Au cours de nos travaux de recherche, la caractérisation des réponses au niveau moléculaire des larves dans les différentes conditions de contamination a pu être abordée grâce à une large gamme de biomarqueurs à différents niveaux moléculaires, allant de l'expression génique jusqu'au niveau protéique et les différents aspects biochimiques. En fait, l'un des principaux enjeux de notre travail de recherche était de développer et valider des marqueurs moléculaires précoces d'exposition et d'altération chez les premiers stades de développement de moule. Ces marqueurs pourraient être utilisés dans les études en milieu naturelle et la biosurveillance, non seulement sur des moules mais aussi sur d'autres espèces de bivalves. Nos résultats ont montré une surexpression précoce des gènes de défense antioxydants et de réparation de l'ADN après exposition au Cu et à l'Ag et au stress thermique chez les premiers stades de vie des moules. De plus, une augmentation des activités enzymatiques anti-oxydantes a été montrée avec les températures plus élevées. Cela peut confirmer notre hypothèse d'un système de défense fonctionnel et efficace chez les premiers stades de vie des moules. Les faibles teneurs en taux de peroxydation lipidique (MDA) mesurés chez les larves exposées peuvent accentuer l'efficacité du système antioxydant pour contrebalancer la production des EROs. Notre étude suggère que les larves de moules exposées à une augmentation de température modérée pourraient avoir une capacité compromise pour se défendre contre les dommages de l'ADN au niveau moléculaire. Également, la toxicité observée chez les larves peut dépendre d'autres processus biologiques modifiés plutôt que du bilan du stress oxydatif. *Une perspective à notre étude serait d'étudier les processus biologiques associés comme le dépôt de la conchyoline et l'organisation du cytosquelette ainsi que le repliement des protéines pour établir une image claire de la réponse cellulaire suite à l'exposition au métal et au stress thermique au début de la vie des moules. De plus, une étude des profils d'expression des protéines de choc thermique serait très intéressante pour mieux comprendre leur implication dans le système de défense des stades précoces de vie des moules.*

Les résultats obtenus montrent d'une part, que les différents biomarqueurs étudiés en laboratoire sont pertinents pour caractériser un profil d'adaptation et de toxicité chez les premiers stades de vie de la moule. D'autre part, ils montrent que

la température est un facteur abiotique qui impacte particulièrement le développement des embryons et larves de moule. Cependant, avec le changement climatique prévu dans les prochaines décennies, plusieurs autres paramètres physico-chimiques tels que la salinité, le pH, l'hydrodynamique, etc. . . pourraient être modifiés. La modification de ces paramètres pourrait également impacter la survie et le développement des jeunes stades de moule. *L'une des pistes à envisager serait d'évaluer l'effet combiné de plusieurs autres facteurs abiotiques sur le développement embryo-larvaire de la moule pour avoir une évaluation plus juste de l'impact global du changement climatique sur le recrutement larvaire chez la moule.*

Dans cette thèse, les géniteurs de moule utilisés sont d'une provenance connue et destinés à la consommation humaine, ils sont donc à priori peu ou pas contaminés. Il est bien connu que l'histoire de vie des parents pourrait affecter la survie et le devenir de leurs descendants. *Dans ce contexte Il serait intéressant d'envisager des études sur des larves issues de géniteurs provenant de milieux présentant des niveaux ou des profils de pollution contrastés pour étudier leur vulnérabilité ou tolérance à la pollution.*

Le troisième objectif de cette thèse de doctorat était le développement et l'optimisation d'un logiciel pour l'analyse et la caractérisation du comportement natatoire des larves D de moule à partir d'enregistrements vidéo. Au cours de cette étude, nous avons pu distinguer trois types de mouvements : rectiligne, circulaire ou surplace. Nos résultats confirment l'efficacité et la rapidité de l'analyse des marqueurs comportementaux des organismes aquatiques en réponse à une variété de stress environnementaux. Notre étude a montré que l'augmentation de la température et la contamination métallique perturbent le comportement natatoire des larves de moule ce qui pourrait au final compromettre la survie et la dispersion de ces animaux dans leur environnement naturel. Les larves en condition de stress thermique ainsi que métallique montrent une tendance à effectuer des trajectoires circulaires. La question qui se pose, est-ce que les larves D issues de ces différents traitements peuvent poursuivre normalement leur développement larvaire? *Pour répondre à cette question il serait intéressant d'envisager une expérience de télé-captage. Cette technique, habituellement utilisée pour capter des naissains d'huitre en milieu naturel, consiste à étudier la fixation sur des supports en milieu contrôlé des larves produites en écloserie et sur le point de se métamorphoser. Cette technique pourrait être utilisée sur des larves de moules produites en laboratoire et incubées en présence ou non des polluants étudiés jusqu'au stade naissain. Un suivi régulier du nombre de larves malformées et du comportement natatoire au cours des différents stades larvaires peut être envisagé. A la fin, le nombre des larves s'étant fixées sera déterminé et sera mis en relation avec les données de malformations et d'anomalies du comportement larvaire.*

Le quatrième objectif de notre travail était la comparaison de la sensibilité des

larves des espèces *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis*, ainsi que leurs hybrides face à l'augmentation de température et à la contamination métallique en utilisant le test embryo-larvaire de toxicité. Les résultats de la présente étude confirment que l'hybridation entre *M. edulis* et *M. galloprovincialis* est possible et produit des larves qui survivent après la fécondation au moins jusqu'au stade larve D. Nos résultats ont mis en évidence une variabilité inter-géniteurs chez les différentes espèces étudiées. En l'écologie, la variation individuelle est considérée comme une condition préalable à l'évolution. Ce travail confirme l'hypothèse générale selon laquelle la survie, la croissance et le développement des larves de moules varient en fonction de l'espèce et de la température et suggèrent que la gamme de tolérance thermique des larves de moules est espèce-spécifique. Les données obtenues montrent que les larves de *M. edulis* sont plus sensibles à la température que les larves *M. galloprovincialis*. Ceci est en accord avec la répartition géographique de ces deux espèces. En effet, la moule *M. galloprovincialis* est présente majoritairement dans des eaux plus chaudes de la Méditerranée et du sud de l'Atlantique alors que *M. edulis* est plus abondante dans les eaux plus froides de l'Atlantique nord.

Bien que les performances larvaires face aux conditions environnementales des moules *M. edulis* par rapport *M. galloprovincialis* aient déjà largement été étudiées, celles de leurs hybrides restent encore peu connues. Les données de cette étude ont montré que les larves hybrides issues d'une femelle *M. galloprovincialis* sont significativement plus tolérantes à l'augmentation de température par rapport aux hybrides issus d'une femelle *M. edulis*. L'hypothèse qui peut être avancée serait que ces différences de sensibilité sont principalement le résultat des effets maternels. *Une approche moléculaire pourrait être réalisée sur les larves hybrides afin de comprendre les bases moléculaires de cette plus grande tolérance des hybrides à la pollution et à l'accroissement de température.* Toutefois, cela ne pourra pas refléter toute la complexité des processus dans la nature. *Comme perspective à notre travail, et afin de mieux comprendre la production et le développement des larves hybrides en milieu naturel, des collectes in situ de larves D au moment de la reproduction pourraient être réalisées en différents sites notamment dans le golfe de Gascogne afin de déterminer la fréquence des larves hybrides et pures, ainsi que la fréquence et la nature des déformations des larves dans les conditions environnementales.*

A l'issue de cette thèse de doctorat, des résultats novateurs ont été obtenus et plusieurs perspectives ont été proposées. Notre travail de recherche a souligné l'impact du changement global et de la pollution métallique sur les performances larvaires des moules. L'ensemble des résultats obtenus constitue une première étape pour prévoir et décrire l'évolution future des populations de moules face aux changements environnementaux.

Annexes

**Article 1 : High sensitivity of
embryo-larval stage of the
Mediterranean mussel, *Mytilus
galloprovincialis* to metal pollution
in combination with temperature
increase**



High sensitivity of embryo-larval stage of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* to metal pollution in combination with temperature increase



Khoulood Boukadida^{a, b}, Mohamed Banni^b, Pierre-Yves Gourves^a, Jérôme Cachot^{a, *}

^a Univ. Bordeaux, Laboratory of Oceanic and Continental Environments and Paleoenvironments, EPOC, UMR CNRS 5805, F-33600, Pessac, France

^b Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, ISA, Chott-Mariem, 4042 Sousse, Tunisia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 July 2016

Received in revised form

11 September 2016

Accepted 17 September 2016

Available online 19 September 2016

Keywords:

Copper

Silver

Global warming

Mediterranean mussel

Embryotoxicity

ABSTRACT

The present work aimed to assess the effects of two widespread metallic pollutants, copper and silver, along with environmentally-realistic temperature increases, on embryo-larval development of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. First, mussel embryos upon fertilization were exposed for 48 h to increasing concentrations of Cu (0.5–500 µg/L) and Ag (0.1–100 µg/L) at different temperatures (18, 20, 22 or 24 °C) in order to characterize toxicity of each toxicant at the different tested temperatures. Increasing concentrations of a Cu–Ag mixture were then tested in order to assess the mixture effect at different temperatures (18, 20 or 22 °C). Embryotoxicity was measured after 48 h of exposure (D-larvae stage) considering both the percentage of abnormalities and developmental arrest in D-larvae. The results suggest that the optimum temperature for mussel larvae development is 18 °C (12.65 ± 1.6% malformations) and beyond 20 °C a steep increase of abnormal larvae was observed up to 100% at 24 °C. Ag was more toxic than Cu with a 50% effective concentration (EC50) at 18 °C of 6.58 µg/L and 17.6 µg/L, respectively. Temperature increased the toxicity of both metals as proved with the EC50 at 20 °C at 3.86 µg/L and 16.28 µg/L for Ag and Cu respectively. Toxic unit calculation suggests additive effects of Cu and Ag in mixture at 18 and 20 °C. These results highlight a possible impairment of *M. galloprovincialis* reproduction in the Mediterranean Sea in relation to increase of both pollutants and water temperature due to global warming.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Marine invertebrates living and reproducing in polluted coastal areas affected by different types of chemicals - including heavy metals - may be impacted at different levels of biological organization (Devi et al., 1996). Copper is a natural and essential element which play an important role in organism functions (Szczytkas et al., 1994). However, elevated concentrations of this metal can be highly toxic (Viarengo, 1989; Negri et al., 2013). Anthropogenic uses of copper are primarily in fungicides (Reichelt-Brushett and Harrison, 2005) and in antifouling paints (Alsterberg et al., 2007), thus increasing copper concentrations in the marine environment, especially in coastal ecosystems. In aquatic ecosystems, copper concentration range from 0.2 to 30 µg/L in the water column, but is

generally below 5 µg/L (Willis and Bishop, 2016).

The marine ecosystem is also contaminated with non-essential trace metals such as silver (Ag). Ag ion has been shown to be one of the most toxic heavy metals for aquatic invertebrates (Lam and Wang, 2006). Silver salts are used extensively as antimicrobial agents, particularly silver nitrate (AgNO₃) (Maillard and Hartemann, 2012). It has been used for decades in a number of anthropogenic activities, such as mining and photographic processing, as well as being employed in biocides and antimicrobial treatments (Bianchini et al., 2005; Suárez et al., 2010; Behra et al., 2013; Zhang et al., 2014). Silver concentration in water is up to 0.01 µg/L in unpolluted areas and 0.01–0.1 µg/L in urban and industrialized areas. Much higher concentrations were found in seawater from Galveston Bay, USA (8.9 µg/L) and 260 µg/L near photographic manufacturing waste discharges (Howe and Dobson, 2002).

Studies on toxic interactions of heavy metals indicated the occurrence of additive effects, synergistic effects, as well as

* Corresponding author.

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

antagonistic effects (Wu et al., 2008).

In addition, global warming represents an additional stress to coastal ecosystems. Surface water temperatures are expected to increase notably in the next decades between 1.4 °C and 3.1 °C and between 2.6 °C and 4.8 °C according to respectively IPCC's simulations RCP 6.0 and RCP 8.5 (IPCC, 2014) and will impact marine life if thermal stress is approaching or exceeding the limits of thermal tolerance (Hofmann and Todgham, 2010). Reproduction of marine invertebrates is highly sensitive to temperature, which is a key factor for spawning and development of invertebrate gametes and larvae (Thorson, 1950). Aquatic invertebrates are particularly sensitive to temperature fluctuations because of their ectothermic biology (Pat et al., 2000). Among marine species, the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*, is an important candidate in environmental monitoring programs. Due to their wide distribution, sedentary lifestyle, filter feeding behavior, and tolerance for a large range of environmental conditions, this species has been widely used as a sentinel organism for marine pollution bio-monitoring (Banni et al., 2007; Viarengo et al., 2007). Life stages of *M. galloprovincialis*, have different tolerances to chemical pollutants but embryo-larval stages are particularly sensitive to pollutant exposure (His et al., 1999; Byrne et al., 2008). Biochemical, physiological and molecular responses of *M. galloprovincialis* adults or juveniles to environmental stressors have been well documented (LeBlanc et al., 2005; Attig et al., 2014; Banni et al., 2014a and 2014b). While the acute bivalve embryo-larval assay is extensively used for evaluating chemical toxicity and water or sediment quality (His et al., 1999; Geffard et al., 2001; Beiras and Albentosa, 2004; Quiniou et al., 2005; Mai et al., 2012; Fabbri et al., 2014), data on impacts of pollutants in combination with other physical-chemical stressors on early developmental stages of bivalves are more limited (Deruytter et al., 2015; Gamain et al., 2016). This study aims to investigate the impacts of increasing water temperatures and metal pollution on *M. galloprovincialis* embryo-larval development. The *M. galloprovincialis* embryo larval assay was used to (1) evaluate the effect of a moderate increase in water temperature on embryonic development, (2) to determine the embryotoxicity of copper and silver alone and in mixture and (3) to investigate the developmental impact of combined exposure to both metals and temperature increase.

2. Material and methods

2.1. Test chemicals and sea water

Copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, CAS 7758-99-8, 99.999%) and silver nitrate (AgNO_3 , CAS 7761-88-8, 99.999%) were of analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Seawater was collected from the "Banc d'Arguin" (Arcachon Bay, SW of France). Immediately after sampling, seawater was filtered (FSW) using a 0.22 μm pore membrane filter and stored at 4 °C in the dark.

2.2. Physical and chemical analysis

Dissolved oxygen level, salinity and pH were measured in FSW for each set of replicated conditions at T0 and T48h. Dissolved oxygen concentration (Do) was measured using an oxygen electrode coupled to a FIBOX3 PRESSENS and using PST3v 602 software. Salinity was measured using a WTW Conductivity Meter. pH was measured using an epoxy-body combination electrode, coupled to a Microprocessor pH meter, (pH 537) and calibrated with standard pH buffer solutions (HANNA Instruments, Romania).

The working solutions were chemically analyzed to confirm metal concentrations. Stock solutions, aliquots solutions and FSW,

50 ml each, were acidified with 5% final nitric acid (Nitric acid 65%, Fluka). All the water samples were analyzed by inductively-Coupled Plasma Optic Emission Spectrometry (ICP-OES 720, Agilent Technologies) except the reference FSW and the lowest tested dose of Ag and Cu which were analyzed by atomic absorption spectrophotometer (Varian SpectrAA 240Z, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Method blanks were added to each set of samples. The validity of the method was periodically checked with Dolt-5 certified materials (Dogfish Liver Certified Reference Material for Trace Metals and other Constituents, NRCC-CNRC, CANADA) and values obtained were within the certified ranges. Concentrations were expressed in $\mu\text{g/L}$ dissolved Cu^{2+} or Ag^+ . For ICP-OES, detection limit (DL) was 0.4 $\mu\text{g/L}$ and 2.26 $\mu\text{g/L}$ for silver and copper respectively and for atomic absorption spectrophotometer DL was 0.04 $\mu\text{g/L}$ and 0.5 $\mu\text{g/L}$ for silver and copper respectively.

2.3. Toxicity assay

Stock solutions of copper (250 mg/L) and silver (100 mg/L) were prepared in Milli-Q water and stored at 4 °C. Two independent sets of experiments were performed: for single chemicals, aliquots of copper (0.5, 5, 15, 50 and 500 $\mu\text{g/L}$) and silver (0.1, 1, 3, 10, 30 and 100 $\mu\text{g/L}$) were prepared by diluting the stock solution in FSW. In a second set of experiments, binary equitoxic mixtures were prepared by mixing Ag and Cu at their effective concentrations EC5, EC10, EC25 and EC50. Unspiked FSW was used as negative control.

Mature *M. galloprovincialis* from Spain (farmed mussels) were induced to spawn by thermal stimulation alternating immersion in 0.2 μm FSW at 15 °C and 20 °C for 30 min each. Spawners were isolated in glass beakers containing 250 ml of 0.2 μm FSW. Egg quality and sperm motility were assessed using a microscope at 200 \times magnification. After spawning, sperm and eggs were sieved separately through 50 μm and 100 μm meshes, respectively, to remove debris. For each experiment, eggs and sperm from two individuals were selected according to their quality and counted under microscope. Egg suspension of one female was fertilized by sperm suspension of one male in the ratio of approximately 1:10. The embryo toxicity assay used in the present study was described in details by His et al. (1999), Quiniou et al. (2005) and AFNOR (2009). Fertilization success was checked briefly under a microscope (10–15 spermatozoa should be attached to each egg membrane) and only batches of fertilized eggs with fertilization success > 90% were used. Sixteen minutes after fertilization, volumes corresponding to 300 eggs were transferred into one well of a 24-well microplate (Cellstar, Greiner Bio-one) containing 2 mL of the contaminant solution. For single chemical toxicity, these microplates were incubated in a temperature-controlled chamber (Snijder Scientific) at 18; 20; 22 or 24 °C for 48 h in the dark and at 18, 20 or 22 °C for mixture toxicity test. During the experiment, the average salinity value was 31.2 ± 0.16 (u.s.i), oxygen saturation levels ranged from 99% to 103.3% and pH varied from 7.9 to 8.01. At the end of the 48 h-incubation, buffered formalin was added at 1% final concentration. The percentage of abnormal D-shaped larvae was determined by direct observation of one hundred larvae under an inverted microscope at magnification 400 \times equipped with a digital camera and an image acquisition software (Nikon eclipse). Assays were validated if the percentage of normal D-shaped larvae was above 80% for the controls (Quiniou et al., 2005) except for the treatment conditions at 22 °C and 24 °C with or without metals. Developmental arrest (embryos that have not reached the D-shaped larval stage) and larvae exhibiting developmental defects such concaved hinge, malformed or damaged shell, protruded mantle were recorded on 100 individuals per replicate. Four analytical replicates were performed for each condition and each experiment was replicated three times using three different pairs of genitors.

2.4. Data analysis

For dose-response analysis and ECx calculation, data were transformed into percent net abnormalities, according to Abbott's formula:

$$\text{Percent net abnormalities} = \frac{\% \text{ treatment abnormal} - \% \text{ control abnormal}}{100 - \% \text{ control abnormal}} \times 100$$

Dose-response curves and effective concentration (ECx) calculation for both single metals and mixtures, were determined using REGTOX software for Microtox Excel™ (MSEExcel macro REGTOX EV7.0.5.xls). The REGTOX software available online at: <http://eric.vindimian.9online.fr/> (Vindimian, 2005) uses a sigmoid function (Hill model) to plot dose-response curves. The ECx is defined as the toxicant concentration causing x % reduction in the embryogenesis success.

For mixture, toxic units (TU) were calculated using the following formulae:

$$\text{TU}_i = \text{Ci}/\text{EC50}_i \text{ and } \text{TU}_{\text{sum}} = \sum \text{Ci}/\text{EC50}_i$$

Ci is the concentration of each toxicant in the mixture at 50% response and EC50i the half maximal efficient concentration for each individual toxicant (Sprague and Ramsay, 1965). According to Broderius et al. (1995), if TU_{sum} equal 1 ± 0.2 interaction is considered as additive, if $\text{TU}_{\text{sum}} < 0.8$ interaction is synergistic and if $\text{TU}_{\text{sum}} > 1.2$ interaction is antagonistic.

All data is expressed as mean \pm standard error (SE). Percentages were first transformed with the following function $p' = \arcsin \sqrt{p}$. P corresponds to the raw data (% of abnormalities) specified in p values from 0 to 1 (Legendre and Legendre, 1998). Since data was not normally distributed ($p > 0.05$, Shapiro-Wilk test), statistical comparisons were performed by the non-parametric Kruskal–Wallis test. Differences among data between conditions were then tested using Kruskal post hoc test (equivalent to the Tuckey HSD test for non-parametric data). Significance differences were accepted when $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Effect of temperature on mussel embryo-larval development

The effect of temperature on mussel embryo-larval development is reported in Fig. 1. The minimum malformation rate ($12.6 \pm 1.6\%$) was obtained at 18 °C. At 20 °C the abnormality rate reached $16.7 \pm 2.1\%$ but was not significantly different from 18 °C. In contrast, abnormal larvae increased significantly ($p < 0.05$) at 22 °C ($67.1 \pm 1.8\%$) to reach 100% at 24 °C. Besides, no significant variations of pH and dissolved oxygen of FSW were measured during the assay.

Recently, many studies have investigated the impact of temperature fluctuation associated with global warming in marine invertebrates (Hallare et al., 2005; Tomanek, 2010; Byrne, 2011; Callaway et al., 2012; Banni et al., 2014a; 2014b). Early life stages were reported to be more sensitive than adults to sub-lethal effects of temperature because of their incomplete development and their high mitotic rate, which increase the likelihood of abnormalities (Byrne and Przeslawski, 2013). This study is one of the first demonstrating that increased temperatures have a negative impact on the larval stage of *M. galloprovincialis*. Data from this study also

confirms that 18 °C is an optimum temperature for the embryonic development of this mussel species (His et al., 1997). According to the percentage of larval abnormalities (<20%), it can be stated that the temperature range 18–20 °C is suitable to carried out embryo-larval assay with *M. galloprovincialis*. This result is consistent with

literature data (Beiras and Albentosa, 2004; Paredes et al., 2014). Altogether our results indicate that in our laboratory conditions, *M. galloprovincialis* early life stages are very sensitive to a moderate increase in water temperature and values above 22–23 °C markedly impair embryonic development.

3.2. Toxicity of copper or silver alone

Cu and Ag were measured in the water media, and concentrations were globally close to nominal concentrations except for the lowest tested dose of Cu (Table 1). For this reason, all the ECx and TU values were expressed using nominal concentrations.

Embryotoxic effects of single metal exposure in *M. galloprovincialis* are illustrated in Fig. 2A for copper and Fig. 2B for silver. The two metals exhibited a significant dose-dependent effect on embryo-larval development characterized by an increase in the rate of abnormal D-larvae with metal concentration. Significant embryotoxicity ($p < 0.05$) was observed from the lowest tested concentration of Cu (0.5 µg/L) and Ag (1 µg/L) with respectively 23.9% and 19.7% of abnormal D-larvae. At 50 µg/L of copper and 30 µg/L of silver, the percentage of abnormality reached 100% with mainly late developmental arrests. The different effective concentration (ECx) values of the two metals were calculated and presented in Table 2. Silver proved to be more toxic than copper with a 48h-EC50 at 18 °C of 6.58 µg/L (5.65–7.23) and 17.6 µg/L (12.49–17.72) respectively.

Early life stages of bivalves have been shown to be highly sensitive to trace metal exposure (Nadella et al., 2009; Prato and Biandolino, 2010; Gamain et al., 2016). To date, no data is available for Ag. For Cu, Fabbri et al. (2014) reported a EC50 value of 8.7 µg/L while Prato and Biandolino (2010) obtained a higher value at 40 µg/L for the same species.

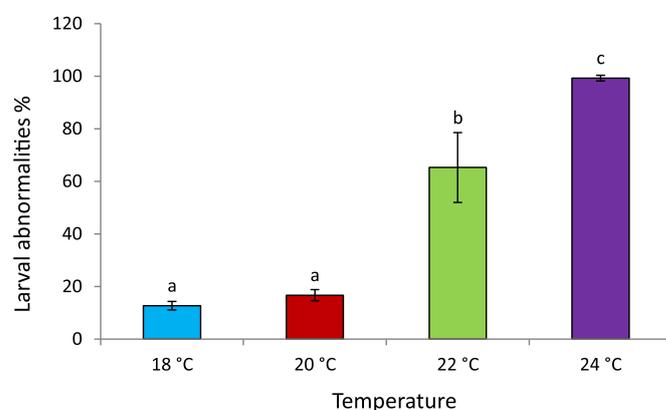


Fig. 1. Percentages (Mean \pm SD) of abnormal D-larvae following *Mytilus galloprovincialis* embryo exposure to different temperatures. Different letters indicate significant differences between treatments ($N = 3$, $p < 0.05$, Kruskal–Wallis).

Table 1
Dissolved copper and silver concentrations in single and mixture solutions at 18 °C.

FSW	Concentration Ag ⁺ (µg/L)			Concentration Cu ²⁺ (µg/L)			
	Nominal	Measured	Recovery (%)	Nominal	Measured	Recovery (%)	
	<LD			< LD			
Cu alone				0.5	1.49	298	
				5	4.97	99.4	
				15	13.73	91.5	
				50	43.12	86.2	
Ag alone	0.1	< DL	–				
	1	1.10	109.8				
	3	2.85	94.9				
	10	8.63	86.3				
	30	25.02	83.4				
Mixture							
	EC5Cu + EC5Ag	0.88	0.51	57.9	4.8	5.83	121.4
	EC10Cu + EC10Ag	1.47	1.01	68.7	6.67	6.99	104.8
	EC25Cu + EC25Ag	3.11	2.27	73.0	10.83	10.98	101.4
EC50Cu + EC50Ag	6.58	4.84	73.5	17.6	16.55	94.0	

DL: detection limit is 0.04 µg/L for Ag and 0.5 µg/L for Cu, FSW: reference filtered sea water.

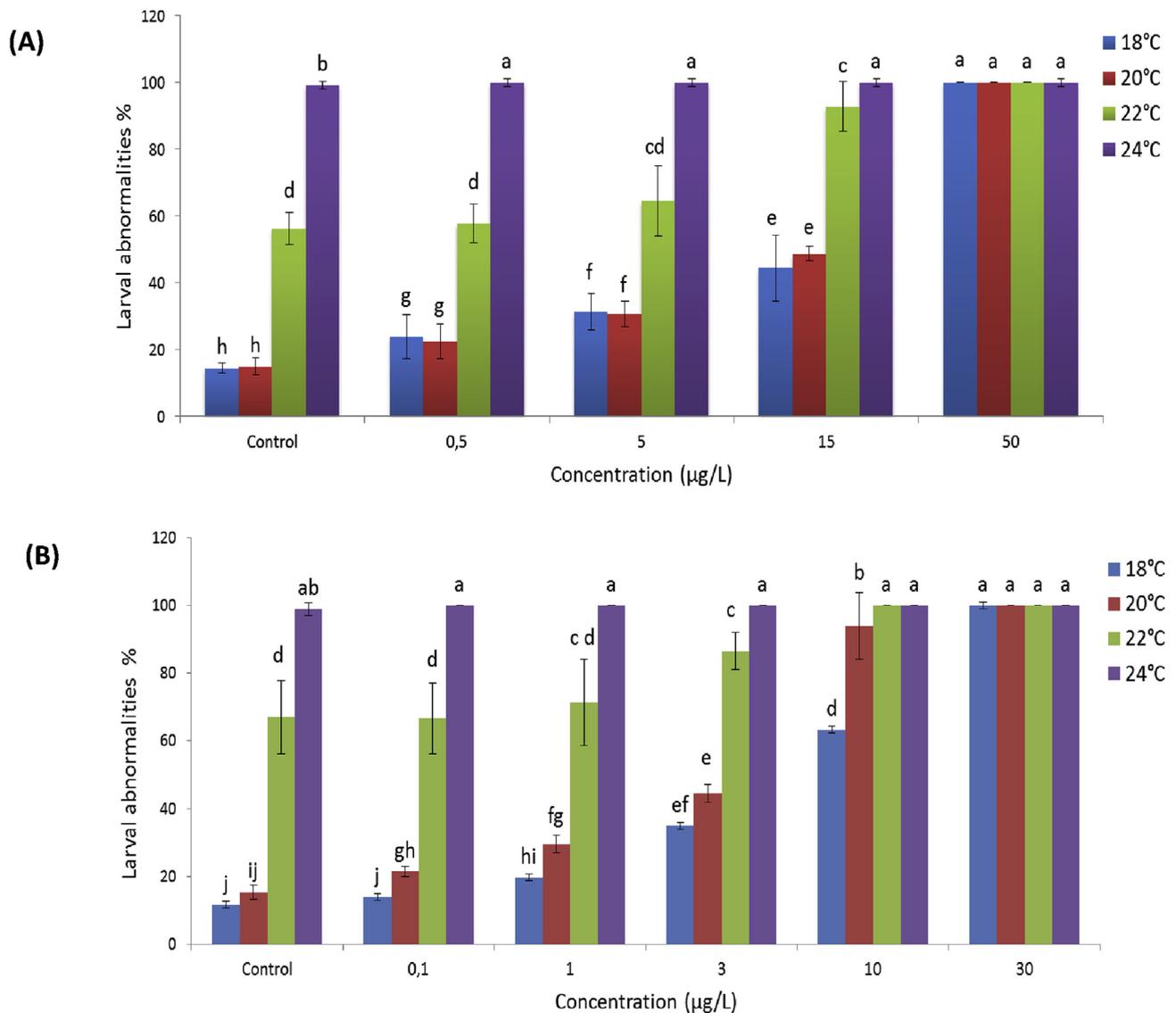


Fig. 2. Percentages (Means ± SD) of abnormal D-larvae following *Mytilus galloprovincialis* embryo exposure to different concentrations of copper sulfate (Cu²⁺) (A) or silver nitrate (Ag⁺) (B) along with a temperature gradient. Different letters indicate significant differences between treatments (N = 3, p < 0.05, Kruskal-Wallis).

Table 2
48h-EC50 values ($\mu\text{g/L}$) with 95% confidence intervals, EC5, EC10, EC20, EC25 of copper and silver alone at different temperatures.

	Temperature	EC50	CI95%	EC5	EC10	EC15	EC20	EC25
Cu ($\mu\text{g/L}$)	18 °C	17.60	12.49–17.72	4.80	6.67	8.18	9.54	10.83
	20 °C	16.28	12.01–16.42	3.92	5.63	7.04	8.33	9.8
	22 °C	8.64	6.44–10.8	3.18	4.09	4.80	5.40	5.95
Ag ($\mu\text{g/L}$)	18 °C	6.58	5.65–7.23	0.88	1.47	2.01	2.55	3.11
	20 °C	3.86	2.94–4.04	0.82	1.21	1.55	1.86	2.17
	22 °C	2.34	1.86–2.8	0.52	0.77	0.97	1.16	1.34

Cu is an essential element needed at low levels to marine organisms, however it has been shown to be very toxic when in excess (Viarengo et al., 1988; Deb and Fukushima, 2007; Gomiero and Viarengo, 2014). In the present study, embryotoxicity ($p < 0.05$) of copper was shown from the lowest tested concentration (0.5 $\mu\text{g/L}$), and further increased with Cu increasing. Similar results were obtained when embryos of *Mytilus trossolus* (Fitzpatrick et al., 2008) and *Crassostrea gigas* (Mai et al., 2012; Gamain et al., 2016). In the life cycle of *Mytilus edulis*, embryonic stage has been shown to be the more sensitive stage to copper (Hoare et al., 1995). This can be explained, at least in part, by its high metabolic rate and the high susceptibility of enzymes to oxidative damage. Indeed, any alterations in enzyme activity can dramatically impair certain metabolic pathway and reduce development and survival (Fitzpatrick et al., 2008). Interestingly, the lowest observed effect concentration (LOEC) of Cu obtained herein (0.5 $\mu\text{g/L}$) is similar or even below concentration values currently found along the European coasts in the range of 0.04–4.8 $\mu\text{g/L}$ (Tueros et al., 2008).

To our knowledge, this paper is the first to assess the embryotoxicity of silver ion on the mediterranean mussel. Results of the present study confirm the high toxicity of Ag^+ on aquatic invertebrates. The literature contains only a handful of studies on the toxicity of silver on embryonic stage of aquatic invertebrates such as bivalves and sea urchins (Table 3). The effect of silver ions on mussel larvae was detected at lower concentrations than for most other aquatic species except *C. virginica*. Anyway, these concentrations are much higher than those currently found in marine and estuarine areas which are usually below 30 ng/L (Barriada et al., 2007).

3.3. Toxicity of Cu-Ag mixture

The combined effects of simultaneous exposure of mussel embryos to copper and silver are presented in Fig. 3. A significant increase of the percentage of malformed D-larvae ($p < 0.05$) was observed with increasing concentrations of Cu-Ag mixture at 18 °C. TU_{sum} calculated for an equitoxic mixture of Cu and Ag gave a value of 1.1 indicating an additive effect of both metals (Table 4).

The marine environment is subjected to a mixture of toxicants which can interact to produce adverse effects in aquatic organisms. The combined effects of pollutant mixtures can be qualified as either synergistic, antagonistic or additive. Our results are consistent with those of Coglianesse and Martin (1981) who demonstrated that copper and silver interact additively on the embryonic development of the Pacific oyster *C. gigas*. Effects of metals in mixture are much more complicated than single metal and many hypotheses can explain these divergent results. The mode of action of copper and silver has been already documented (Le et al., 2013; Liu et al., 2014). Copper was reported to affect membrane permeability by increasing the membrane potential and by blocking ion channels. At low concentrations, silver ions act as a blocker of K^+ channel and at larger concentrations, they increase membrane permeability (Coskun et al., 2012). This may explain the interactive effects observed between Cu and Ag ions acting in the same way by affecting membrane permeability and ion channels. Moreover, toxicity of Cu-Ag mixtures may depend of metal concentrations and combinations (Le et al., 2013; Liu et al., 2014). According to Lucas and Horton (2014), silver has greater impact when it is combined with low concentration of copper; otherwise copper has predominant deleterious effects.

3.4. Influence of temperature on metal toxicity

Temperature impact on metal toxicity was estimated by analysing the dose-response curve and calculation of EC50 at 18 °C, 20 °C and 22 °C. Calculation was not performed for the mixture at 22 °C due to high larval abnormality levels (about 80%) in all treatment groups (Fig. 3). Elevation of temperature had dramatically increased the toxicity of both metals tested individually as proved with the marked decline of EC50 (Table 2). EC50 for the mixture was also much lower at 20 °C (8.06 $\mu\text{g/L}$) in comparison to 18 °C (13.97 $\mu\text{g/L}$). Besides, TU_{sum} value for the mixture was also shown to decrease from 1.1 at 18 °C to 0.85 at 20 °C. Altogether, these results clearly indicate that a slight elevation of water temperature increase the susceptibility of mussel larvae to metal toxicity.

The effect of temperature on aquatic organism sensitivity to

Table 3
Silver toxicity (EC50 in $\mu\text{g/L}$) in embryos and larvae of different aquatic invertebrates.

Species	Endpoint	Silver concentration ($\mu\text{g/L}$)	References
Bivalves			
<i>Spisula solidissima</i>	48h-EC50	14	Zoto and Robinson, 1985
<i>Mercenaria mercenaria</i>	48h-EC50	21	Calabrese et al., 1977
<i>Crassostrea virginica</i>	48h-EC50	5.8	Calabrese et al., 1977
<i>Crassostrea gigas</i>	48h-EC50	16–18	Coglianesse and Martin, 1981
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	48h-EC50	6.6	This study
Sea urchins			
<i>Arbacia punctulata</i>	48h-EC50	36	Ward et al., 2016
<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	120h-EC50	24	Dinnel et al., 1989
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	120h-EC50	15	Dinnel et al., 1989
<i>Dendraster excentricus</i>	72h-EC50	33	Dinnel et al., 1989

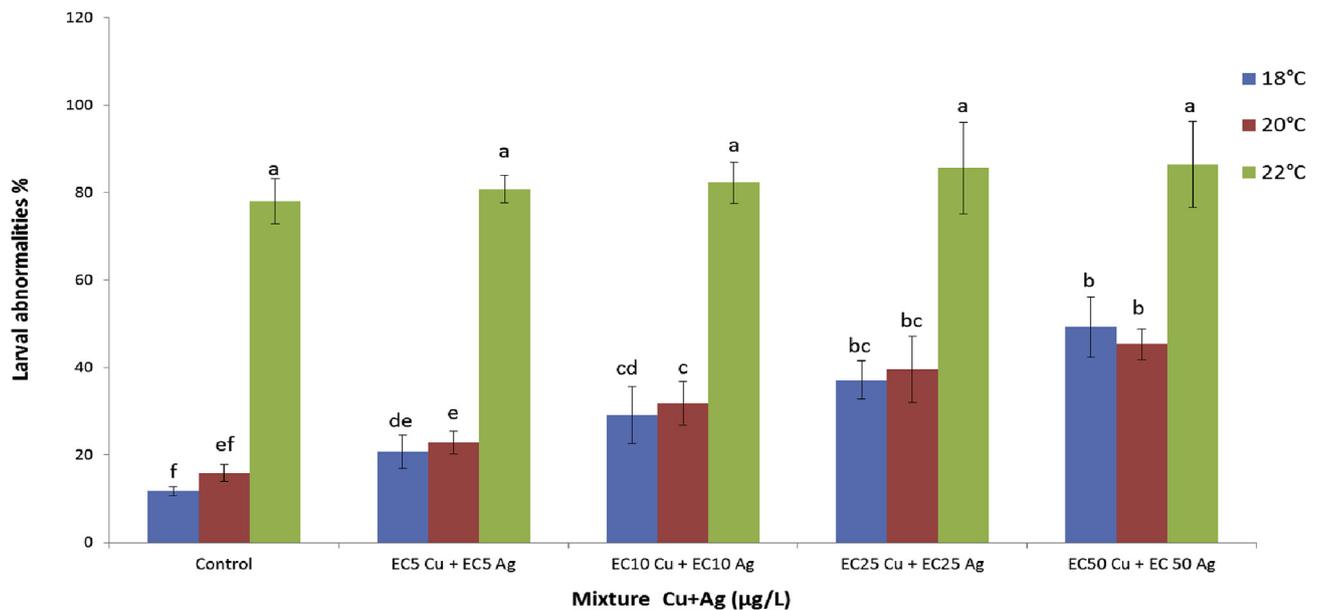


Fig. 3. Percentages (Means \pm SD) of abnormal D-larvae following *Mytilus galloprovincialis* embryo exposure to different Cu^{2+} - Ag^+ mixtures concentrations at three temperatures. Different letters indicate significant differences between treatments ($N = 3$, $p < 0.05$, Kruskal-Wallis).

Table 4
48h-EC50 \pm CI95% ($\mu\text{g/L}$), CEx ($\mu\text{g/L}$) and TU values for the mixture of Ag and Cu at equitoxic concentrations 50% and for different temperatures.

	EC50	CI95%	EC5	EC10	EC15	EC20	EC25	TU _{ag}	TU _{cu}	TU _{sum}
18 °C	13.97	7.34–59.73	2.07	3.36	4.54	5.69	6.85	0.474	0.617	1.091
20 °C	8.06	6.55–35.08	2.82	3.69	4.35	4.92	5.45	0.466	0.385	0.851

pollutants has already been documented in the ecotoxicological context (Cairns et al., 1975; Tomanek and Zuzow, 2010; Negri et al., 2013; Banni et al., 2014a; 2014b). However, only a few studies described the interactive effects between temperature and trace metals on early life stage of bivalves. It has been demonstrated that in invertebrates like in vertebrates, the temperature-metal interaction follows an increasing curve, thus temperature increase tend to move up metal toxicity on organisms (Cairns et al., 1975). Bat et al. (2000) noted that mortality of *Gammarus pulex* was increased with increasing copper concentrations and temperature regimes. Sokolova and Lannig (2008) hypothesised that the increase sensitivity of organisms to metals at elevated temperatures could result from the increase of water solubility and hence bioavailability of metals and by higher contaminant uptake due to metabolism increase. However, Attig et al. (2014) provided evidence about the reduction of the ventilation rate in *M. galloprovincialis* exposed to higher temperatures, thus affecting uptake rate of contaminants.

4. Conclusion

The present study provides first lines of evidence about the sensitivity of early life stages of the Mediterranean mussel *M. galloprovincialis* to water temperature and silver pollution. Significant embryotoxicity was observed following exposure to a low temperature increase and moderate concentrations of silver and copper. Combine exposure to environmentally-realistic water temperature and metal pollution could affect tolerance limits and impair development and reproduction success of *M. galloprovincialis*. Our data must be carefully considered in view of the probable increase of metal contamination and water

temperature in the intertidal zones of the Mediterranean Sea due to global warming.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the French and Tunisian Governments. This study was supported by the European Union in the framework of the Erasmus Mundus EU Metallic II Program. This work was part of the LABEX COTE cluster of excellence "Continental to coastal Ecosystems: evolution, adaptability and governance". We thank James Emery for English proofreading.

References

- AFNOR, X.P.T., 2009. Water Quality – Bioindicator of Potential Toxicity in Aqueous Media – Determination of the Potential Toxicity of Aqueous Samples on Bivalves Embryo-larval Development, pp. 90–382.
- Alsterberg, C., Sundbäck, K., Larson, F., 2007. Direct and indirect effects of an anti-fouling biocide on benthic microalgae and meiofauna. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 351, 56–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2007.06.006>.
- Attig, H., Kamel, N., Sforzini, S., Dagnino, A., Jamel, J., Boussetta, H., Viarengo, A., Banni, M., 2014. Effects of thermal stress and nickel exposure on biomarkers responses in *Mytilus galloprovincialis* (Lam). Mar. Environ. Res. 94, 65–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.12.006>.
- Banni, M., Dondero, F., Jebali, J., Guerbej, H., Boussetta, H., Viarengo, A., 2007. Assessment of heavy metal contamination using real-time PCR analysis of mussel metallothionein mt10 and mt20 expression: a validation along the Tunisian coast. Biomarkers 12, 369–383. <http://dx.doi.org/10.1080/13547500701217061>.
- Banni, M., Hajer, A., Sforzini, S., Oliveri, C., Mignone, F., Boussetta, H., Viarengo, A., 2014a. Transcriptomic responses to heat stress and nickel in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 148, 104–112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.004>.
- Banni, M., Hajer, A., Sforzini, S., Oliveri, C., Boussetta, H., Viarengo, A., 2014b. Transcriptional expression levels and biochemical markers of oxidative stress in *Mytilus galloprovincialis* exposed to nickel and heat stress. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 160, 23–29. <http://dx.doi.org/10.1016/>

- j.cbpc.2013.11.005.
- Barriada, J.L., Herrero, R., Prada-Rodríguez, D., Sastre de Vicente, M.E., 2007. Waste spider crab shell and derived chitin as low-cost materials for cadmium and lead removal. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 39–46.
- Bat, L., Akbulut, M., Culha, M., Gundogdu, A., Satilmis, H.H., 2000. Effect of temperature on the toxicity of zinc, copper and lead to the freshwater amphipod *Gammarus pulex pulex* (L., 1758). *Turk. J. Zool.* 24, 409–415.
- Behra, R., Sigg, L., Clift, M.J.D., Herzog, F., Minghetti, M., Johnston, B., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., 2013. Bioavailability of silver nanoparticles and ions: from a chemical and biochemical perspective. *J. R. Soc. Interface* 10, 20130396. <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2013.0396>.
- Beiras, R., Albetosa, M., 2004. Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals; implications for the implementation of seawater quality criteria. *Aquaculture* 230, 205–213. [http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00432-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00432-0).
- Bianchini, A., Playle, R.C., Wood, C.M., Walsh, P.J., 2005. Mechanism of acute silver toxicity in marine invertebrates. *Aquat. Toxicol.* 72, 67–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.11.012>.
- Broderius, S., Kahl, M.D., Hoglund, M.D., 1995. Use of joint toxic response to define the primary mode of toxic action for diverse industrial organic chemicals. *Env. Toxicol. Chem.* 14, 1591–1605.
- Byrne, M., Oakes, D.J., Pollak, J.K., Laginestra, E., 2008. Toxicity of landfill leachate to sea urchin development with a focus on ammonia. *Cell Biol. Toxicol.* 24, 503–512. <http://dx.doi.org/10.1007/s10565-008-9099-1>.
- Byrne, M., 2011. Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages: vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 49, 1–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.10.00>.
- Byrne, M., Przeslawski, R., 2013. Multistressor impacts of warming and acidification of the ocean on marine invertebrates' life histories. *Integr. Comp. Biol.* 53, 582–596. <http://dx.doi.org/10.1093/icb/ict049>.
- Cairns, J., Heath, A.G., Parker, B.C., 1975. Temperature influence on chemical toxicity to aquatic organisms. *J. Water Pollut. Control Fed.* 47, 267–280.
- Calabrese, A., MacInnes, J.R., Nelson, D.A., Miller, J.E., 1977. Survival and growth of bivalve larvae under heavy-metal stress. *Mar. Biol.* 41, 179–184. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00394024>.
- Callaway, R., Shinn, A.P., Grenfell, S.E., Bron, J.E., Burnell, G., Cook, E.J., Crumlish, M., Culloty, S., Davidson, K., Ellis, R.P., Flynn, K.J., Fox, C., Green, D.M., Hays, G.C., Hughes, A.D., Johnston, E., Lowe, C.D., Lupatsch, I., Malham, S., Mendzil, A.F., Nickell, T., Pickrell, T., Rowley, A.F., Stanley, M.S., Tocher, D.R., Turnbull, J.F., Webb, G., Wootton, E., Shields, R.J., 2012. Review of climate change impacts on marine aquaculture in the UK and Ireland. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 22, 389–421. <http://dx.doi.org/10.1002/aqc.2247>.
- Coglianesi, M.P., Martin, M., 1981. Individual and interactive effects of environmental stress on the embryonic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. The toxicity of copper and silver. *Mar. Environ. Res.* 5, 13–27. [http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136\(81\)90019-2](http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136(81)90019-2).
- Coskun, D., Britto, D.T., Jean, Y.K., Schulze, L.M., Becker, A., Kronzucker, H.J., 2012. Silver ions disrupt K⁺ homeostasis and cellular integrity in intact barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *J. Exp. Bot.* 63, 151–162. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/err267>.
- Deb, S.C., Fukushima, T., 2007. Metals in aquatic ecosystems: mechanisms of uptake, accumulation and release-Ecotoxicological perspectives. *Int. J. Environ. Stud.* 56, 385–417. <http://dx.doi.org/10.1080/00207239908711212>.
- Deruytter, D., Vandegehuchte, M.B., Garrevoet, J., De Laender, F., Vergucht, E., Delbeke, K., Blust, R., De Schampheleere, K.A.C., Vincze, L., Janssen, C.R., 2015. Salinity and dissolved organic carbon both affect copper toxicity in mussel larvae: copper speciation or competition cannot explain everything. *Environ. Toxicol. Chem.* 34 (6), 1330–1336. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2924>.
- Devi, M., Thomas, D.A., Barber, J.T., Fingerman, M., 1996. Accumulation and physiological and biochemical effects of cadmium in a simple aquatic food chain. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 38–43. <http://dx.doi.org/10.1006/eesa.1996.0004>.
- Dinzel, P.A., Link, J.M., Stober, Q.J., Letourneau, M.W., Roberts, W.E., 1989. Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticides. *Archives Environ. Contam. Toxicol.* 18 (5), 748–755.
- Fabbri, R., Montagna, M., Balbi, T., Raffo, E., Palumbo, F., Canesi, L., 2014. Adaptation of the bivalve embryotoxicity assay for the high throughput screening of emerging contaminants in *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 99, 1–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.05.007>.
- Fitzpatrick, J.L., Nadella, S., Bucking, C., Balshine, S., Wood, C.M., 2008. The relative sensitivity of sperm, eggs and embryos to copper in the blue mussel (*Mytilus trossulus*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 147, 441–449. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.01.012>.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Pardon, P., Tapie, N., Gourves, P.Y., Budzinski, H., Morin, B., 2016. Combined effects of pollutants and salinity on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 113, 31–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.11.002>.
- Geffard, O., His, E., Budzinski, H., Seaman, M., Garrigues, P., 2001. Qualité biologique de l'eau de mer évaluée in situ par le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*. *Comptes Rendus l'Académie Des. Sci. - Ser. III - Sci. la Vie* 324, 1149–1155. [http://dx.doi.org/10.1016/S0764-4469\(01\)01396-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0764-4469(01)01396-8).
- Gomiero, A., Viarengo, A., 2014. Effects of elevated temperature on the toxicity of copper and oxytetracycline in the marine model, *Euplotes crassus*: a climate change perspective. *Environ. Pollut.* 194, 262–271. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2014.07.035>.
- Hallare, A.V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H.-R., Triebkorn, R., 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Therm. Biol.* 30, 7–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.06.002>.
- His, E., Seaman, M.N.L., Beiras, R., 1997. A simplification of the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Res.* 31, 351–355. [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00244-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00244-8).
- His, E., Beiras, R., Seaman, M.N.L., 1999. The assessment of marine pollution - bioassays with bivalve embryos and larvae. *Adv. Mar. Biol.* 1–178. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60428-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60428-9).
- Hoare, K., Davenport, J., Beaumont, A.R., 1995. Effects of exposure and previous exposure to copper on growth of veliger larvae and survivorship of *Mytilus edulis* juveniles. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 120, 163–168. <http://dx.doi.org/10.3354/meps120163>.
- Hofmann, G.E., Todgham, A.E., 2010. Living in the now: physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 127–145. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135900>.
- Howe, P., Dobson, S., 2002. *Silver and Silver Compounds: Environmental Aspects*. Geneva World Health Organization.
- IPCC, 2014. Summary for Policymakers, Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9781107415324>.
- Lam, I.K.S., Wang, W.-X., 2006. Accumulation and elimination of aqueous and dietary silver in *Daphnia magna*. *Chemosphere* 64, 26–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.12.023>.
- Le, T.T.Y., Vijver, M.G., Kinraide, T.B., Peijnenburg, W.J.G.M., Hendriks, A.J., 2013. Modelling metal-metal interactions and metal toxicity to lettuce *Lactuca sativa* following mixture exposure (Cu²⁺-Zn²⁺ and Cu²⁺-Ag⁺). *Environ. Pollut.* 176, 185–192. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.01.017>.
- LeBlanc, N., Landry, T., Stryhn, H., Tremblay, R., McNiven, M., Davidson, J., 2005. The effect of high air and water temperature on juvenile *Mytilus edulis* in Prince Edward Island, Canada. *Aquaculture* 243, 185–194. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.035>.
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. *Numerical Ecology, Developments in Environmental Modelling*. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8892\(98\)80052-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-8892(98)80052-3).
- Liu, Y., Vijver, M.G., Peijnenburg, W.J.G.M., 2014. Comparing three approaches in extending biotic ligand models to predict the toxicity of binary metal mixtures (Cu-Ni, Cu-Zn and Cu-Ag) to lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Chemosphere* 112, 282–288. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.077>.
- Lucas, C.H., Horton, A.A., 2014. Short-term effects of the heavy metals, Silver and copper, on polyps of the common jellyfish, *Aurelia aurita*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 461, 154–161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2014.08.003>.
- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H., Morin, B., 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2663–2670. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.10.009>.
- Maillard, J.-Y., Hartemann, P., 2012. Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. *Crit. Rev. Microbiol.* 39, 1–11. <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2012.713323>.
- Nadella, S.R., Fitzpatrick, J.L., Franklin, N., Bucking, C., Smith, S., Wood, C.M., 2009. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossulus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 149, 340–348. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.09.001>.
- Negri, A., Oliveri, C., Sforzini, S., Mignone, F., Viarengo, A., Banni, M., 2013. Transcriptional response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) following exposure to heat stress and copper. *PLoS One* 8, e66802. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0066802>.
- Paredes, E., Perez, S., Rodil, R., Quintana, J.B., Beiras, R., 2014. Ecotoxicological evaluation of four UV filters using marine organisms from different trophic levels *Ischrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus*, and *Siriella armata*. *Chemosphere* 104, 44–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.053>.
- Pat, W., Stone, G., Johnston, I.A., 2000. *Environmental Physiology of Animals*. Blackwell Publishing. <http://dx.doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>.
- Prato, E., Biandolino, F., 2010. Combined toxicity of mercury, copper and cadmium on embryogenesis and early larval stages of the *Mytilus galloprovincialis*. *Environ. Technol.* 28, 915–920. <http://dx.doi.org/10.1080/09593332808618851>.
- Quiniou, F., His, E., Delesmont, R., Caisey, X., Grouhel, A., Thébaud, M.-J., 2005. Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux: bio-essai «Développement embryo-larvaire de bivalve». Éd. Ifremer, Méthodes d'analyse en milieu Mar.
- Reichelt-Brushett, A., Harrison, P., 2005. The effect of selected trace metals on the fertilization success of several scleractinian coral species. *Coral Reefs* 24, 524–534. <http://dx.doi.org/10.1007/s00338-005-0013-5>.
- Sokolova, I.M.I.M., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Clim. Res.* 37, 181–201. <http://dx.doi.org/10.3354/cr00764>.
- Sprague, J.B., Ramsay, B.A., 1965. Lethal levels of mixed copper-zinc solution for juveniles salmon. *J. Fish. Res. Board. Can.* 22, 425–432.
- Suárez, M., Esteban-Tejeda, L., Malpartida, F., Fernández, A., Torrecillas, R., Moya, J.S., 2010. Biocide activity of diatom-silver nanocomposite. *Mater. Lett.* 64, 2122–2125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2010.06.061>.

- Szczypkas, M.S., Wemmie, J.A., Moye-rowley, W.S., Thieles, J., 1994. A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *Biol. Chem.* 269, 22853–22857.
- Thorson, G., 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biol. Rev.* 25, 1–45. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-185X.1950.tb00585.x>.
- Tomanek, L., 2010. Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species' biogeographical distribution ranges and metabolic costs. *J. Exp. Biol.* 213, 971–979. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.038034>.
- Tomanek and Zuzow, 2010. The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance limits and metabolic costs of thermal stress. *J. Exp. Biol.* 213, 3559–3574. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.041228>.
- Tueros, I., Rodríguez, J.G., Borja, A., Solaun, O., Valencia, V., Millán, E., 2008. Dissolved metal background levels in marine waters, for the assessment of the physico-chemical status, within the European Water Framework Directive. *Sci. Total Environ.* 407, 40–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.08.026>.
- Viarengo, A., Mancinelli, G., Orunesu, M., 1988. Effects of sublethal copper concentrations, temperature, salinity and oxygen levels on calcium content and on cellular distribution of copper in the gills of *Mytilus galloprovincialis* lam.: a multifactorial experiment. *Mar. Environ. Res.* 24 (1–4), 227–231.
- Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.* 1, 295–317.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 146, 281–300. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.011>.
- Vindimian, E., 2005. MSEXcel macro REGTOX EV7.0.5.xls. Available online. <http://eric.vindimian.9online.fr/> (accessed on 5 07 2011).
- Ward, T.J., Kramer, J.R., Boeri, R.L., Gorsuch, J.W., 2016. Chronic toxicity of silver to the sea urchin (*Arbacia punctulata*). *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (6), 1568–1573.
- Willis, B.E., Bishop, W.M., 2016. Understanding fate and effects of copper pesticides in aquatic systems. *J. Geosci. Environ. Prot.* 04, 37–42. <http://dx.doi.org/10.4236/gep.2016.45004>.
- Wu, Y., Lin, C., Yuan, L., 2008. Phototaxis index of *Daphnia carinata* as an indicator of joint toxicity of copper, cadmium, zinc, nitrogen and phosphorus in aqueous solutions. *Ecol. Indic.* 8, 69–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.01.006>.
- Zhang, S., Liu, L., Pareek, V., Becker, T., Liang, J., Liu, S., 2014. Effects of broth composition and light condition on antimicrobial susceptibility testing of ionic silver. *J. Microbiol. Methods* 105, 42–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.009>.
- Zoto, G.A., Robinson, W.E., 1985. The toxicity of one-hour silver exposures to early-life stages of the surf *Spisula solidissima* (Dillwyn). *Mar. Environ. Res.* 16, 61–75. [http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136\(85\)90020-0](http://dx.doi.org/10.1016/0141-1136(85)90020-0).

**Article 2 : Early and efficient
induction of antioxidant defense
system in *Mytilus galloprovincialis*
embryos exposed to metals and heat
stress**



Early and efficient induction of antioxidant defense system in *Mytilus galloprovincialis* embryos exposed to metals and heat stress



Khouloud Boukadida^{a,b}, Jérôme Cachot^b, Christelle Clérandaux^b, Pierre-Yves Gourves^b, Mohamed Banni^{a,c,*}

^a Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, ISA, Chott-Mariem, 4042, Sousse, Tunisia

^b University Bordeaux I, Laboratory of Oceanic and Continental Environments and Paleoenvironments, EPOC, UMR 5805, F-33400, Talence, France

^c Department of Environmental and Life Sciences, University of Piemonte Orientale Amedeo Avogadro, Via Bellini 25 G, 15100, Alessandria, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Heat stress
Metal bioaccumulation
Gene expression
Oxidative stress
D-larvae
Mediterranean mussel

ABSTRACT

The present study aims to elucidate the stress response of early life stages of *Mytilus galloprovincialis* to the combine effects of selected metals and elevated temperature.

For this purpose, we investigated the response of a large panel of oxidative stress markers such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) activities and lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substrates (TBARS) concentration) and metallothionein accumulation (MT) as well as selected gene transcription level and metal accumulation in mussels larvae exposed to a sub-lethal concentration of Cu (9.54 µg/L), Ag (2.55 µg/L) and mixture of the two metals (Cu (6.67 µg/L) + Ag (1.47 µg/L)) along with a temperature gradient (18, 20 and 22 °C) for 48 h.

Cu and Ag applied as single or mixture were differentially accumulated in mussel larvae according to the exposure temperature. Sod, cat, gst and mt-10 gene transcription levels showed an important increase in larvae exposed to Cu, Ag or to the mix compared to the control condition at 18 °C. The same pattern but with higher induction levels was recorded in larvae co-exposed to metals at 20 °C. At 22 °C, a significant decrease in mRNA abundance of cat, gst and sod and a significant up-regulation of mts targets (mt10 and mt20) were observed.

Results: suggest that co-exposure to metals and moderate elevated temperature (20 and 22 °C) significantly increased the antioxidant enzyme activities of catalase (CAT), and glutathione-S-transferase (GST) and caused an increase of metal and metallothionein concentrations. In contrast, no significant change in lipid peroxidation products measured as TBARS content was observed indicating a protective response of anti-oxidative system.

This study provides first evidences of the early and efficient protective response of antioxidant defense mechanisms in mussel's early life stages facing in multi stressors situations.

1. Introduction

Estuaries and coastal waters are particularly at risk due to anthropogenic pollution. It is always very difficult from only contamination body burden data to obtain information about pollutants significance upon animal health. Trace elements represent one of the most widespread and serious form of environmental contamination (Cardwell et al., 2013).

Copper (Cu) is an essential metal that can be harmful presents excessive amounts in the ecosystem (O'Brien and Keough, 2014). Cu is widely used in agriculture as fungicide (Okoro et al., 2011; Reichelt-Brushett and Harrison, 2005). It is also used as a biocide in antifouling paint formulations (Okoro et al., 2011). European Union program, Marine Ecosystem Evolution in a Changing Environment, determined

that Cu is released into the marine environment in large amount, and is present at high concentrations along the coast as well as in the water column in the open sea. Its concentration is often particularly high in sediments (28–233 mg/g) (Haynes and Loong, 2002), and interstitial waters (Çevik et al., 2008; Negri et al., 2013). Furthermore, Cu has been shown to be highly toxic to aquatic organisms including embryos of invertebrates (Gamain et al., 2016; Mai et al., 2012; Manzl et al., 2004; Nadella et al., 2009).

In the last decades, silver (Ag) contamination has received growing attention due to its various industrial applications such as biocide, antimicrobial agent in clothing, on product surfaces, in cosmetics and personal hygiene products (Luoma, 2008). Ag is a metal of high environmental relevance that has been shown to exert acute and long-term toxic effects to aquatic biota such as microorganisms

* Corresponding author at: Laboratory of Biochemistry and Environmental Toxicology, ISA, Chott-Mariem, 4042, Sousse, Tunisia.
E-mail address: m_banni@yahoo.fr (M. Banni).

(Fabrega et al., 2011), invertebrates (Wang and Rainbow, 2005), particularly bivalves (Gomes et al., 2013) and fish (Bruneau et al., 2015). In addition to the direct production of free radicals, Ag was suspected to cause depletion of the antioxidant enzymes system (Carlson et al., 2008) and therefore it should be considered a pro-oxidant agent.

One of the main fears of society is climate change. Climate projections predict significant changes in ocean chemistry and increases in air and ocean temperature by 2100. Surface water temperatures are expected to increase notably in the next decades between 1.4 °C and 3.1 °C and between 2.6 °C and 4.8 °C according to RCP 6.0 and RCP 8.5 simulations respectively (IPCC, 2014; IPCC, 2007).

Cu and Ag along with thermal stress are known to enhance reactive oxygen species (ROS) production in the cells (Negri et al., 2013; Gagné et al., 2013) thereby increasing the risk of oxidative alteration. ROS formation and induced damage are balanced by a range of cellular antioxidant defenses including various antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (Cat), glutathione peroxidase (GPx), as well as low molecular binding peptides such as metallothioneins and glutathione that function as radical quenchers and as chain-breaking compounds (Dondero et al., 2005; Livingstone, 2001).

Mollusks, particularly *Mytilus* sp., are currently used in large monitoring programs to study the accumulation of pollutants in their tissues and the consequent effects of this accumulation on biological processes (Banni et al., 2009; Canesi et al., 2011; Viarengo et al., 2007). However, marine invertebrate embryos and larvae are several orders of magnitude more sensitive to toxicants than adults (His et al., 1999; Ringwood, 1991), and have frequently been used for the assessment of marine pollution (Geffard et al., 2001; His et al., 1999; Mai et al., 2012).

The current investigation aims to evaluate the complex effect of model trace elements (Cu and Ag) on the early life stage of mussel depending on the temperature. For this we first sought to investigate the effects of sublethal Cu and Ag concentrations on three anti-oxidant stress enzymes CAT, SOD and GST activities as well as metallothionein and MDA accumulation in the D-larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. Secondly, and based on available DNA sequence information for *M. galloprovincialis*, the expression levels of five selected gene involved in the antioxidant response were monitored by quantitative reverse-transcription PCR: catalase (cat); cytosolic superoxide dismutase (sod), glutathione S-transferase (gst) and metallothionein gene variants (mt-10 and mt20).

2. Material and methods

2.1. Chemicals and sea water

Reference contaminants (CuSO₄·5H₂O and AgNO₃) were analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Seawater was collected from the “Banc d’Arguin” which is a natural reserve located just outside the Arcachon Bay (SW France). Immediately after sampling, seawater was filtered successively using 5, 1 and 0.2 µm pore membrane filter. Filtered seawater (FSW) was stored at 4 °C in the dark and was used within 3 days.

2.2. Embryo production and exposure

Mature mussels (*M. galloprovincialis*) were purchased from Spain. In laboratory, mussels were induced to spawn by thermal stimulation (Quiniou et al., 2005). Spawning females and males were isolated in 250 mL of FSW to obtain a gametes-dense solution. Then oocytes and spermatozoa were filtered through a 100 µm and 50 µm nylon membrane respectively. Gametes from different genitors were observed under a microscope and the most reproductive pair (regular oocytes and very mobile spermatozoa) was selected for the experiment. Oocytes were fertilized by sperm suspension in the ratio of approximately 1:10.

Fifteen to sixteen minutes after fertilization, embryos were counted and placed into 41 beakers (150,000 fertilized eggs/L) filled with 0.2 µm FSW and oxygenated with air-pump (three replicates per treatment).

Cu (EC20 = 9.54 µg/L), Ag (EC20 = 2.55 µg/L) and the mixture of both metals (Cu EC10 = 6.67 µg/L and Ag EC10 = 1.47 µg/L) were tested at three temperatures (18, 20 and 22 °C). The metal concentrations were selected according to a previous work (Boukadida et al., 2016). 600,000 embryos were incubated in the chosen condition for 48 h in the dark until D-larvae were obtained. After incubation, larvae were recovered on a sieve (45 µm), rinsed with few mL of FSW, counted and divided in three aliquots: approx. 40,000 larvae were stored in 500 µL of RNAlater® at –20 °C for transcriptomic analysis, and the rest (about 560,000) was stored at –80 °C for biochemical analyses. For metal bioaccumulation analysis, larvae (approx. 600,000) of one couple were used to have a sufficient quantity of biological material. This material was stored at –80 °C until analysis.

2.3. Metal analysis in water and larvae

The working solutions were chemically analyzed to confirm metal concentrations. Aliquots solutions and FSW, 50 mL each, were acidified with 5% final nitric acid (Nitric acid 65%, Fluka) and stored at 4 °C until analysis.

Larvae were digested by nitric acid (HNO₃). Briefly, between 20 and 50 mg of dried larvae were collected in polypropylene tubes to which 1 mL of HNO₃ was added. Then, this mixture was heated by Hot Block for 3 h at 100 °C, and after cooling, 5 mL of ultrapure water (Milli-Q®) were added.

At the meantime, 4 tubes containing the international certified reference material (DOLT-5 samples, Fish liver) were prepared in order to verify the accuracy of the method. The values for each sample were always within the certified ranges (Cu: 35.0 ± 2.4 mg/kg and Ag: 2.05 ± 0.08 mg/kg). The dry powder (between 80 and 85 mg) and 3 mL of HNO₃ were heated by for 3 h at 100 °C, and 15 mL of Milli-Q water was added to the solution after cooling.

Finally, 4 blank samples were prepared. This time, the tubes were only filled with 3 mL of HNO₃ before heating for 3 h at 100 °C, and 15 mL of Milli-Q water was added after cooling. All metal species were analyzed by Inductively Coupled Plasma Optical Spectrometry (ICP-OES; Agilent Technologies, 700 Series ICP-OES).

2.4. Gene expression

Total RNA was extracted from larvae pools using acid phenol-chloroform precipitation according to (Chomczynski and Sacchi, 1987) with TRI-Reagent (Sigma-Aldrich). RNA was further purified by precipitation in the presence of 1.5 M LiCl₂, and the quality of each RNA preparation was confirmed by UV spectroscopy and TBE agarose gel electrophoresis in the presence of formamide.

Relative mRNA abundances of the mussel genes encoding metallothioneins (mt-10 and mt-20) were evaluated with SYBR Green I chemistry (EvaGreen® dye; Bio-Rad Laboratories; (Banni et al., 2011; Dondero et al., 2011)). The mRNA abundances of the genes encoding catalase, cytosolic superoxide-dismutase and glutathione-S-transferase were evaluated in multiplex Taqman assays according to Negri et al. (2013). Probes and primer pairs (Table 1) were designed using Beacon Designer v3.0 (Premier Biosoft International, Inc.). All primers and dual-labeled Taqman probes were synthesized by MWG-Biotech GmbH (Germany). Each selected cDNA (25 ng RNA reverse-transcribed to cDNA) was amplified in a CFX384 Real-Time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories) with iQTM Multiplex Power mix (Bio-Rad Laboratories) according to the manufacturer's instructions for the triplex protocol. All multiplex combinations accounted for the following dual fluorescence tags: 6-carboxyfluorescein/Black Hole (BH) 1, 6-carboxy-2',4',4',5',7',7'-hexachlorofluorescein/BH1, and Texas Red/BH2. Briefly, each cDNA was amplified in the presence of 1X iQTM

Table 1
Q-PCR primers and Taqman probes.

Gene_ID	Probe	Sense Primer	Antisense Primer
mt10 (AJ625847)	–	GGGCGCCGACTGTAATGTTC	CACGTTGAAGGYCCTGTACACC
mt-20(HQ681036.1)	–	TGTGAAAGTGGCTGCGGA	GTACAGCCACATCCACACGC
Cat (AY580271.1)	ACAGCTTGTCTGCCTGCTCAGCAC	ACAAGGATGGACAGGCATACTAC	AATCAGGATGGCATAATCTGGA
Gst (AF527010.1)	ACGCCTGTGTCCCAACAAGTGG	AACTGACCACTCAAGAATATGCC	AGAAAGTCTGCCATTACAAAGCT
Sod(FM177867.1)	AGTCGTCACTGCTACTGTCTCTCTC	TGAAAGGAGATGGTGTGTAC	CAAACCTCGTGAACGTGGAAAC
RiboL27 (AJ625928)	TGCGCCATTGAGCACAAGAATACTAC	AAGCCATGGGCAATTATGAAAA	TTTACAATGACTGCTTACGACCT
Actin (AJ625116)	ACGCCAACACCGTCTTGTCTGGTGG	GTGTGATGTCATATCCGTAAGGA	GCTTGAGCAAGTGTGTGA
18S (L33452)	ACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGC	CGGAGAGGAGCATGAGAAAC	CGTGCCAGGAGTGGGTAATTT

Given are: Gene ID, EMBL or NCBI gene Identifier; Taqman probe, sense primer and antisense primer sequences. All sequences are given 5' to 3'. Legend: AJ625847, mt-10HQ681036.1, mt-20;AY580271.1, cat; AF527010.1; gst; FM177867.1;sod; AJ625928; ribosomal protein genes ribo-L27; AJ625116, actin; L33452, 18S ribosomal RNA.

Multiplex Power mix, 0.3 μM of each primer, and 0.1 of μM each probe (Table 1) in a final volume of 10 μL . Relative expression data were geometrically normalized to 18 S rRNA (L33452), an invariant actin isotype (AJ625116), and ribosomal protein riboL27 (AJ625928) (Negri et al., 2013), which were selected from a list of genes whose expression did not vary over more than 50 conditions (including toxic treatments, stages of the life cycle, and various tissues).

A specific triplex Taqman assay was developed to amplify 0.25 ng of RNA reverse-transcribed to cDNA in the presence of 0.1 μM of each dual-labeled probe (hexachlorofluorescein/BH1 for actin β , Texas Red/BH2 for 18 S rRNA and Hex/BH2 for protein riboL27) and 0.1 μM , 0.4 μM and 0.4 μM of forward and reverse primers, respectively, for 18 S rRNA, actin and protein riboL27 (Table 1). For all Taqman assays, the thermal protocol was as follows: 30 s at 95 °C, followed by 40 cycles of 10 s at 95 °C and 20 s at 60 °C. qRT-PCR was performed with four biological replicates and three technical replicates. For the mt-10 and mt-20 assays, the thermal protocol was as presented by Dondero et al. (2005). Statistical analyses were carried out on the group mean values using a random reallocation test (Pfaffl et al., 2002).

2.5. Biochemical analyses

2.5.1. Preparation of tissue extracts

The larvae were homogenized in a phosphate buffer (0.1 M; pH 7.5) in a 1:3v:v ratio, using an UltraTurrax® tissue homogenizer fitted with a Teflon pestle (800 rpm, 4 °C). The homogenates were then centrifuged for 20 min at 10,000g. All procedures were carried out at 4 °C. Aliquots of the supernatant (S9 fraction) were frozen at –80 °C until analyzed. Determinations of total protein, enzyme assays and MDA levels were all performed on S9 fraction.

2.5.2. Total protein

The protein concentration in the S9 fraction was measured using Lowry et al. (1951) colorimetric method with bovine serum albumin (BSA) as a standard. Protein measurements were carried out using a spectrophotometer microplate reader (Synergy HT, BioTek), and expressed in mg mL^{-1} .

2.5.3. Antioxidant enzyme activities

Catalase activity was assayed as described in Claiborne (1985). The variation of absorbance at 240 nm, caused by the dismutation of hydrogen peroxide, was measured as a function of time consumption using an UVIKON 933 spectrophotometer (BioTek) (extinction coefficient, $\epsilon = 0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Superoxide dismutase (SOD) activity was determined according to the McCord and Fridovich, (1969) method adapted to a microplate reader. Absorbance at 550 nm was recorded for samples and blanks by using a microplate reading UV-spectrophotometer (Synergy HT, BioTek). SOD activity was expressed in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein. GST activity was measured by spectrophotometry (UVIKON 933 spectrophotometer (BioTek)) at 340 nm, according to Habig et al. (1974) ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.5.4. Lipid peroxidation

The level of lipid peroxidation was determined by quantifying the concentration of 2-thiobarbituric acid reactive substrates (TBARS) using the Buege and Aust (1978) method adapted to a micro plate reader. In this assay, 250 μL of S9 fraction was heated at 80 °C for 15 min in a solution containing 20% trichloroacetic acid (TCA) and 2% butylated hydroxytoluene (BHT) and the mixture was centrifuged 15 min at 10000 rpm. Then, 450 μL of supernatant was heated at 80 °C for 1 h in a solution containing 90 μL of 0.6N HCl and 360 μL of Tris-TBA (25–100 mM). The tubes were then cooled, and after mixing, the TBARS level was quantified at 530 nm by using a micro plate-reading UV-spectrophotometer (Biotek Synergy HT). Results were expressed in nmoles of TBARS equivalents per milligram of protein.

2.6. SDS–PAGE—fluorimetric analysis of mussel MT content

The total MT content of mussel's larvae was evaluated using fluorimetric analysis of SDS–PAGE separated thiol labeled proteins, essentially as previously described by Viarengo et al. (1997) and Dondero et al. (2005). The procedure was carried out using the MT PAGE reagent kit, suitable for total MT quantification from tissue samples (Ikzus, Italy). Three independent biological replications were considered in this test. Slab poly-acrylamide gels were scanned using the FluorMax fluorescence analyzer. Statistics Densitometric analyses of bands were performed using Image-Lab™ software (BioRad), and representative gels of each experiment of three independent assays were considered. Only the differences in band intensity $\pm 20\%$ of the control samples were considered relevant.

2.7. Statistical analysis

All data are expressed as means \pm standard error (SE). Homogeneity of variance was checked by the Levene's test and statistical analysis was performed by the Kruskal–Wallis test. Differences among data between conditions were then performed using Kruskal post hoc test (equivalent to the Tuckey HSD test for non-parametric data). Significance difference was accepted when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Cu and Ag concentrations in water

For single metal contamination, measured Ag concentrations were within 158% and 178% of the nominal concentrations while measured Cu concentrations varied from 97% to 120%. For metal mixture contamination, measured Ag concentrations varied from 92% to 99% and Cu from 97% to 123.59% (Table 2). Interestingly a bell shape accumulation pattern was observed along with the temperature gradient (Table 3).

Table 2
Copper and silver concentrations in working solutions.

		Measured concentration (µg/L)		Nominal concentration (µg/L)		% Recovery	
		[Cu]	[Ag]	[Cu]	[Ag]	[Cu]	[Ag]
Control	18 °C	< LD	< LD	NA	NA		
	20 °C	< LD	< LD	NA	NA		
	22 °C	2.623	< LD	NA	NA		
Copper	18 °C	9.25	< LD	9.54	NA	97	
	20 °C	11.45	< LD	9.54	NA	120	
	22 °C	9.93	< LD	9.54	NA	104	
Silver	18 °C	< LD	4.25	NA	2.55	166.66	
	20 °C	< LD	4.546	NA	2.55	178.27	
	22 °C	< LD	4.029	NA	2.55	158	
Mixture	18 °C	7.69	1.348	6.67	1.47	115.29	92
	20 °C	8.24	1.412	6.67	1.47	123.59	96
	22 °C	7.25	1.435	6.67	1.47	108.69	99

Table 3
Cu and Ag content in -D-larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to Cu, Ag and their mixture along with a temperature gradient. Data, expressed as µg/g fresh weight (n=3), for Cu and Ag were analyzed by Kruskal post hoc test (equivalent to the Tuckey HSD test for non-parametric data). Different letters indicate significant differences between different conditions (p < 0.05).

T°	condition	Cu µg/g fresh weight	Ag µg/g fresh weight
18 °C	Control	3.38 ± 0.47 ^a	< DL
	Cu	5.85 ± 0.49 ^b	< DL
	Ag	2.10 ± 0.17 ^c	0.73 ± 0.02 ^a
	Mix	8.33 ± 0.68 ^d	1.76 ± 0.12 ^b
20 °C	Control	3.54 ± 0.29 ^a	< DL
	Cu	16.90 ± 1.42 ^b	< DL
	Ag	9.60 ± 0.85 ^c	4.76 ± 0.31 ^a
	Mix	6.96 ± 0.36 ^d	2.64 ± 0.18 ^b
22 °C	Control	2.52 ± 0.24 ^a	< DL
	Cu	9.38 ± 0.68 ^b	< DL
	Ag	9.56 ± 0.69 ^b	1.22 ± 0.11 ^a
	Mix	4.21 ± 0.31 ^c	0.83 ± 0.01 ^b

3.2. Larvae Cu and Ag concentration

The contents of Cu and Ag in *M. galloprovincialis* larvae after the exposure period are reported in Table 3. Cu and Ag concentrations were significantly increased in larvae exposed to this metal at 18 °C, 20 °C and 22 °C showing a bell shape accumulation with a maximum reach at 20 °C (16.90 µg/g ww for Cu and 4.76 µg/g ww for Ag) when compared to control condition.

3.3. Effects of metals and heat stress on selected antioxidant related genes mRNA expression

Expression analysis of various genes (Cat, Cu/Zn-Sod, Gst, mt-10 and mt-20) encoding antioxidant proteins and metallothionein isoforms was performed by real time quantitative PCR on D-larvae transcripts using 18 S rRNA, actin and protein-ribo-L27 as reference genes (Figs. 1 and 2). A significant increase in cat, sod, gst and the two mt-isoforms transcription levels was observed at 18 °C in larvae exposed to Cu, Ag and their binary mixture when compared to controls. The maximum expression level was observed in mixture exposed larvae (6.88 folds for cat, 5.97 folds for sod, 6.42 folds for gst, 10.74 folds for mt-10 and 2.97 folds for mt-20). The same pattern was observed for all targets when larvae were exposed to 20 °C. However, at 22 °C and while genes

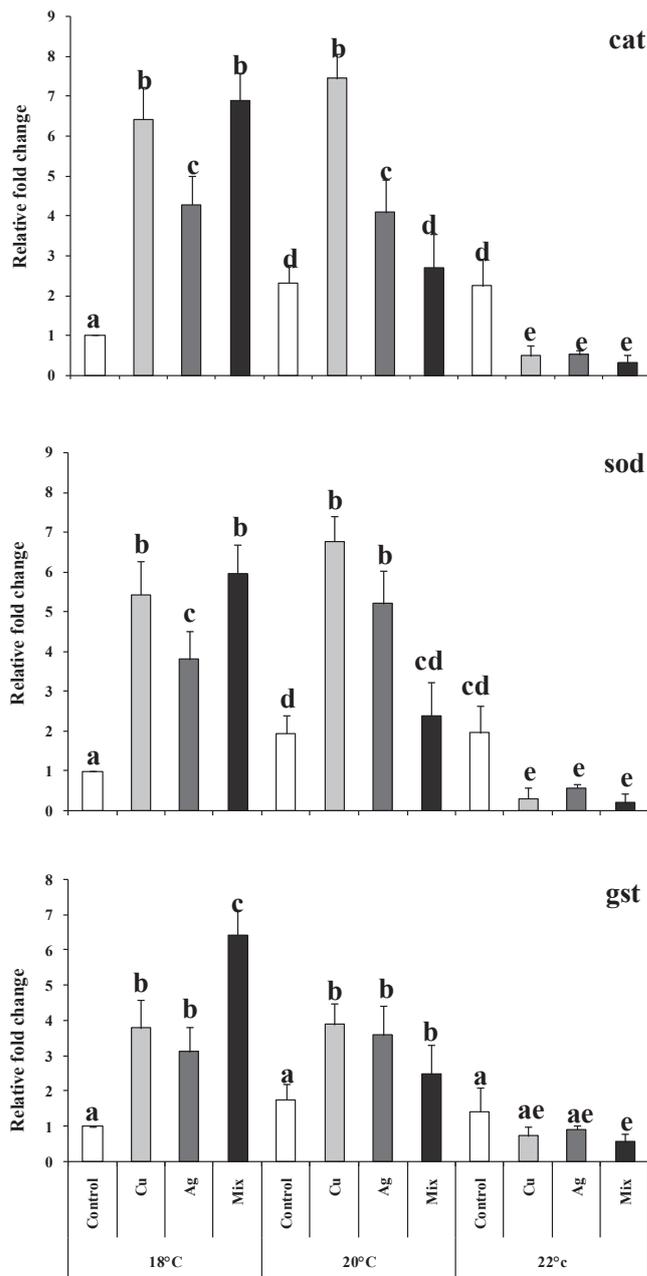


Fig. 1. QPCR data of cat (A), sod (B) and gst (C) targets. Gene expression was performed respect to the reference condition; 18 °C without metals supply and was normalized against Actin, 18S and Ribo L27. Different letters indicate significant differences between different conditions (p < 0.05), threshold cycle random reallocation test according to Pfaffl et al. (2002), n = 4. Larvae were exposed for 48 h to Cu, Ag and their binary mixture along with a temperature gradient (18 °C, 20 °C and 22 °C).

encoding antioxidant proteins exhibited significant down regulation in the presence of metals, the mt-10 and mt-20 targets were maintained up-regulated reaching an absolute maximum in the case of mt-20 with 9.73 folds when compared to control (18 °C without metals supply).

3.4. Effects of metals and heat stress on antioxidant enzymes

The antioxidant activities termed as CAT, SOD and GST exhibited distinct pattern in larvae exposed to Cu, Ag, and their mixture along with the heat stress gradient (Fig. 3). At the physiological temperature (18 °C), a significant increase was recorded for GST activity in larvae exposed to Ag and the binary mixture. However, a significant inhibition was observed for CAT activity in Cu and Cu + Ag exposed larvae. The

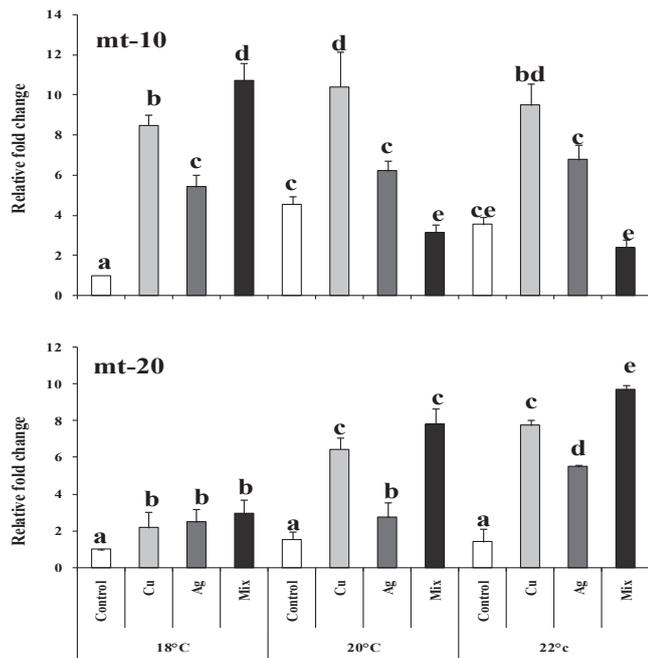


Fig. 2. QPCR data of mt-10 (A) and mt-20 (B) targets. Gene expression was performed respect to the reference condition; 18 °C without metals supply and was normalized against Actin, 18 S and Ribo L27. Different letters indicate significant differences between different conditions ($p < 0.05$), threshold cycle random reallocation test according to Pfaffl et al. (2002), $n = 4$. Larvae were exposed for 48 h to Cu, Ag and their binary mixture along with a temperature gradient (18 °C, 20 °C and 22 °C).

heat stress (20 and 22 °C) without metal supply significantly increases GST and CAT activities. Exposure to Cu at 20 and 22 °C induced a significant increase in GST, and a return to control values for CAT activities. Exposure to Ag along with heat stress exerted a significant increase only for CAT activity (22 °C). Larvae exposed to the binary mixture of Cu and Ag along with heat stress gradient showed a significant increase in CAT and GST activities. For SOD activity no significant change was observed in exposed conditions when compared to the absolute control (18 °C without metal supply) but Cu exposure led to a significant increase of SOD activity at 18 and 22 °C according to the absolute control (18 °C without metal supply).

3.5. Effects of metals and heat stress on TBARS accumulation

Lipid oxidative alteration was investigated through the evaluation of the MDA accumulation in larvae tissues (Fig. 4). No significant increase neither decrease was observed in exposed conditions when compared to the absolute control (18 °C without metal supply).

3.6. Effects of metals and heat stress on metallothionein level

Total MTs protein content was evaluated in D-larvae exposed to Cu/Ag and heat stress for 48 h (Fig. 5). Our data show that MTs content significantly increased in tissues of larvae exposed to metals alone or in combination with heat stress. The highest MTs content was measured in larvae exposed to the mixture of Cu and Ag at 22 °C (5.91 ± 0.47 fold increase respect to control). Cu exposure led to a much higher increase in MTs accumulation than Ag independently of the exposure temperature.

4. Discussion

M. galloprovincialis is among the most economically important bivalve species inhabiting tidal zones in Mediterranean coasts. An increasing body of evidence indicates that tidal zones are challenging

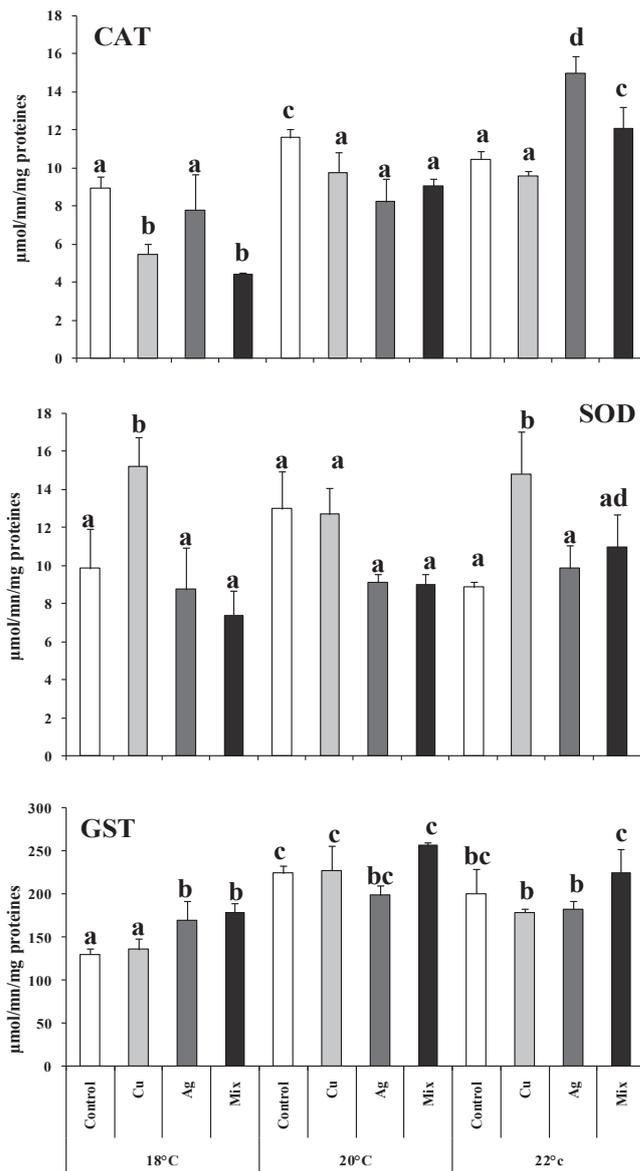


Fig. 3. CAT (A), SOD (B) and GST (C) activities in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to Cu, Ag and their mixture along with a temperature gradient. Larvae were exposed for 48 h to Cu, Ag and their binary mixture along with a temperature gradient (18 °C, 20 °C and 22 °C). Data, expressed as $\mu\text{mole}/\text{mn}/\text{mg}$ proteins for CAT and GST and SOD ($n = 10$), were analyzed by Kruskal post hoc test (equivalent to the Tuckey HSD test for non-parametric data). Different letters indicate significant differences between different conditions ($p < 0.05$). Larvae were exposed for 48 h to Cu, Ag and their binary mixture along with a temperature gradient (18 °C, 20 °C and 22 °C).

severe contamination episodes, such as the metal hotspots associated with global climate change (Attig et al., 2014; Banni et al., 2014; Negri et al., 2013).

A number of case studies have been achieved to evaluate the effects of metals pollution along with heat stress on adult mussel's response at physiological, transcriptomic, proteomic, and metabolomic levels (Gracey et al., 2008; Kamel et al., 2012; Tomanek and Zuzow, 2010). However, only few studies have been dedicated to the evaluation of *Mytilus sp.* early life stage to such environmental stressors despite their vulnerability when compared to adults. In addition, to our knowledge, no studies investigated the effects of heat stress combined to metal exposure (Cu and Ag) on oxidative stress balance in early life stages of mussels and the related transcriptional regulation of related genes that may occur in such situation. To fill the gap, we have measured a set of antioxidant enzyme activities, metallothionein accumulation and their

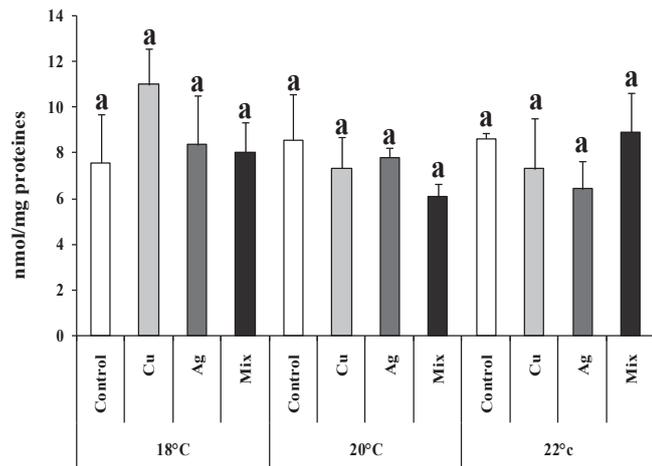


Fig. 4. Lipoperoxidation expressed as TBARS in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to Cu, Ag and their mixture along with a temperature gradient. Larvae were exposed for 48 h to Cu, Ag and their binary mixture along with a temperature gradient (18 °C, 20 °C and 22 °C). Data, expressed as $\mu\text{mole TBARS /mg proteins}$ ($n=10$), were analyzed by Kruskal post hoc test (equivalent to the Tuckey HSD test for non-parametric data). Different letters indicate significant differences between different conditions ($p < 0.05$). Larvae were exposed for 48 h to Cu, Ag and their binary mixture along with a temperature gradient (18 °C, 20 °C and 22 °C).

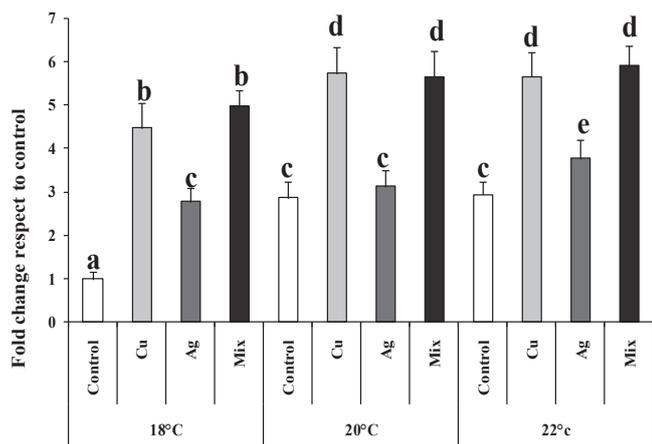


Fig. 5. Metallothioneins protein fold change respect to control in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to Cu, Ag and their mixture along with a temperature gradient. Larvae were exposed for 48 h to Cu, Ag and their binary mixture along with a temperature gradient (18 °C, 20 °C and 22 °C). Data, ($n=4$), were analyzed by Kruskal post hoc test (equivalent to the Tuckey HSD test for non-parametric data). Different letters indicate significant differences between different conditions ($p < 0.05$). Larvae were exposed for 48 h to Cu, Ag and their binary mixture along with a temperature gradient (18 °C, 20 °C and 22 °C).

related gene expression in the early life stage tissues of mussels exposed to sublethal Cu and Ag concentration along with a moderate heat stress (18, 20 and 22 °C).

In this study, metal body burden clearly showed different degrees of Cu and Ag accumulation in the early life stage tissues of mussels from the different experimental conditions. Our results indicated a bell shape accumulation trend of Cu and Ag along with the temperature gradient in larvae exposed to the single compounds. The metal increase was more effective at 20 °C. Several studies suggested that metal accumulation in mollusks is dose and time-dependent (Attig et al., 2014; Negri et al., 2013).

Exposure to Cu, Ag and heat stress differentially affected the activities of CAT, SOD and GST. Overall, the pronounced increase of the latter anti-oxidant enzyme activities was recorded at higher temperatures. However, no effect was recorded at the lipoperoxidation level as indicated by the steady state level of MDA in all the

experimental conditions. Interestingly, the gene expression analysis of the anti-oxidative stress genes (cat, sod, gst) in larvae exposed to the investigated metals and/or heat stress, showed a marked up-regulation pattern. Moreover, while a significant decrease in CAT activity was recorded in larvae exposed to Cu alone or in combination with Ag at the physiological temperature (18 °C), a significant increase was observed for SOD and GST activities at the same conditions.

It is well known that heat stress can cause a physiological disorder in animals, which directly affects the metabolism, resulting in the accumulation of ROS (Abele et al., 2002; Rajagopal et al., 2005; Verlecar et al., 2007). Cu and heat stress are potent inducers of oxidative stress (Gomes et al., 2011; Negri et al., 2013; Pytharopoulou et al., 2011). Conversely to adult specimen of *Mytilus* sp. exposed to Cu (Negri et al., 2013), the same metal exerted a negative effect on the catalase activity at 18 °C. This may suggest that Cu is very toxic to early life stages of mussels, much more than to adults even if the experimental conditions were not exactly the same. Indeed, the higher sensitivity of early life stages of marine invertebrates to environmental stressors such as trace elements has already been reported (His et al., 1999; Ringwood, 1991). The recovery of the catalase activity at higher temperatures in presence of Cu could be explained by a specific response to heat stress as it has been suggested by Gomes et al. (2011) and Pytharopoulou et al. (2011).

In addition to the direct production of free radicals, Ag was suspected to cause depletion of the antioxidant enzyme system (Skalska and Struzyńska, 2015). Indeed, Ag was reported to produce low but measurable levels of free radicals in alveolar macrophages (Carlson et al., 2008). Gomes et al., (2014) reported a significant increase in the anti-oxidative stress enzymes in mussels exposed to sublethal Ag concentrations. Moreover, Ag ions were reported to induce an inflammatory response in the liver of exposed Japanese Medaka, increasing the expression of genes involved in oxidative stress (Chae et al., 2009). Like other organisms, mussels can control the increasing levels of ROS in their tissues activating the cellular antioxidant defense system, composed of both enzymatic as well as non-enzymatic components. Enzymatic pathway consists of producing protective ROS-scavenging enzymes such as SOD, and CAT which convert superoxide anions (O_2^-) into H_2O_2 and then H_2O_2 into H_2O and O_2 (Viarengo et al., 2007). The antioxidant related genes exhibited an atypical expression profile depending on the metal as well as the exposure temperature. This may suggest a transcriptional gene expression regulation in the early life stages tissues of mussels exposed to environmental stressors.

In the present paper, we reported a significant increase of MTs accumulation in tissues of mussel D-larvae exposed to Cu and Ag as well as in larvae only exposed to heat stress. While it is well known that Cu is a potent inducer of MTs, correlation between Ag exposure and MTs induction is still controversial even if Gomes et al. (2014) have recently reported a substantial increase of the MTs content in gills of adult mussels exposed to Ag ions. Moreover, during exposure of primary astrocytes to Ag nanoparticles (AgNPs), the metal-binding protein involved in cell protection against metal-induced toxicity was shown to be up-regulated (Luther et al., 2012). The significant induction of MTs at the protein level as well as mt-10 and mt-20 cognates gene expression in metals and/or heat-treated larvae could be attributed to the presence of both metal and ROS in the cells (Dondero et al., 2005; Viarengo et al., 1999). Indeed, the metal transcription factor 1 (MTF-1), functioning as a sensor of intracellular Zn, is responsible for both basal and Zn/Cu mediated expression of MT-1 in mammalian (Dong et al., 2015). This transcription factor may function in mussels as a sensor of the redox state of the cell, triggering a rapid and specific response to the excessive input of highly electrophilic trace elements or oxidants (Banni et al., 2007; Dondero et al., 2005). Moreover, it is clear from gene expression data that Ag ions behave in the same way as Cu to which mt20 is almost insensitive (Dondero et al., 2005).

Our previous work (Boukadida et al., submitted for publication in Marine environmental Research) provides first lines of evidence about

the high sensitivity of early life stages of the Mediterranean mussel *M. galloprovincialis* to water warming and Ag pollution. Our results suggest that the optimum temperature for mussel larvae development is 18 °C ($12.65 \pm 1.6\%$ malformations). Embryotoxic effects were observed following exposure to a low temperature increase ($67.06 \pm 1.83\%$ malformations at 22 °C) to reach 100% malformations at 24 °C. Cu and Ag were shown to be embryotoxic from concentrations as low as 0.5 µg/L and 1 µg/L respectively. Combine exposure to environmentally-realistic water temperature and metal pollution could strongly affect tolerance limits and impair development and reproduction success of *M. galloprovincialis*. The results from our previous work (Boukadida et al., 2016) combined with this study demonstrate the toxicity of Ag and Cu to mussels embryos at environmentally realistic concentrations and highlighted a possible impairment of *M. galloprovincialis* reproduction capabilities in relation to pollutant exposure and water temperature increase due to global warming. One important issue highlighted in the present study is the disparity between the transcriptional expression trends of target genes and the corresponding enzymatic activities (SOD, GST, CAT) or protein levels (MTs). This may suggest the occurrence of a gene regulation expression at translational level. Another explanation could be that at the transcriptional level we evaluate a specific sequence (one isoform), however at the protein level we are evaluation all the isoforms that can be present as it was well document for the GSTs (Jebali et al., 2013).

Taken all together, it seems that exposure to trace elements and heat stress at environmental concentrations increase larval deformations and developmental arrest and thus compromises their future growth. Indeed, lipid peroxidation was unchanged respect to control as well as the maintain of an optimal anti-oxidant response and a substantial increase of the MTs. One hypothesis to the occurrence of developmental alterations could be the impact of the applied stressors to the cytoskeleton organization and/or the shell formation known to be directly linked to the chitin metabolism (Lockwood et al., 2010). Indeed, the cytoskeleton is likely to be critical for metals and thermo-tolerance in mussel tissues. Moreover, Negri et al. (2013) showed that heat stress (24 °C) and Cu exposure in mussels lead to the up-regulation of genes involved in cytoskeletal protection. They also reported in adults of *Mytilus galloprovincialis* a sustained down-regulation of chitin related metabolism genes under Cu- and heat-stress. In chitin-containing organisms, chitinases are essential for maintaining normal life-cycle functions such as morphogenesis (Merzendorfer and Zimoch, 2003), cell division, and immunity (Kuranda and Robbins, 1991).

5. Conclusion

Global warming is an emerging threat to ecosystems worldwide. This work constitutes a first attempt to clarify how an increase in temperature may exert negative effects on early life stages of marine organisms, particularly those inhabiting coastal environments subject to anthropogenic pollutants. The present study provided clues about the occurrence of an early transcription regulation of antioxidant genes as well as Mts in Cu/Ag and heat stress exposed early life stages of mussels. Cat, sod, gst, mt-10 and mt-20 can be considered as part of the metals and heat stress-early responsive genes prior to increases in measurable cytotoxicity. Moreover, the maintain of low TBARS levels in exposed larvae may stress the efficiency of antioxidant system to counterbalance the production of ROS. Further investigations on associated biological process such as chitin deposition and cytoskeleton organization as well as protein folding are needed to establish clear picture of the cell response following metal and heat stress exposure in early life stages of mussels.

Acknowledgement

The authors would like to acknowledge the French and Tunisian Governments. This study was supported by the European Union in the

framework of the Erasmus Mundus EU Metallic II Program. This work was part of the LABEX COTE cluster of excellence “Continental to coastal Ecosystems: evolution, adaptability and governance”. This work was supported by funds from the Tunisian ministry of higher education, Research Unit “Biochemistry and Ecotoxicology” ISA Chott-Mariem (UR13AGR08).

References

- Abele, D., Heise, K., Pörtner, H.-O., Puntarulo, S., 2002. Temperature dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. *J. Exp. Biol. J. Exp. Biol.* 205 (Pt 13), 1831–1841, (1–4).
- Attig, H., Kamel, N., Sforzini, S., Dagnino, A., Jamel, J., Boussetta, H., Viarengo, A., Banni, M., 2014. Effects of thermal stress and nickel exposure on biomarkers responses in *Mytilus galloprovincialis* (Lam). *Mar. Environ. Res.* 94, 65–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.12.006>.
- Banni, M., Dondero, F., Jebali, J., Guerbej, H., Boussetta, H., Viarengo, A., 2007. Assessment of heavy metal contamination using real-time PCR analysis of mussel metallothionein mt10 and mt20 expression: a validation along the Tunisian coast. *Biomarkers* 12, 369–383. <http://dx.doi.org/10.1080/13547500701217061>.
- Banni, M., Negri, A., Mignone, F., Boussetta, H., Viarengo, A., Dondero, F., 2011. Gene expression rhythms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an annual cycle. *PLoS One* 6, e18904. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018904>.
- Banni, M., Hajer, A., Sforzini, S., Oliveri, C., Boussetta, H., Viarengo, A., 2014. Transcriptional expression levels and biochemical markers of oxidative stress in *Mytilus galloprovincialis* exposed to nickel and heat stress. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 160, 23–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.11.005>.
- Banni, M., Negri, A., Rebelo, M., Rapallo, F., Boussetta, H., Viarengo, A., Dondero, F., 2009. Expression analysis of the molluscan p53 protein family mRNA in mussels (*Mytilus* spp.) exposed to organic contaminants. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 149, 414–418. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.09.017>.
- Boukadida, K., Banni, M., Gourves, P.Y., Cachot, J., 2016. High sensitivity of embryo-larval stage of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* to metal pollution in combination with temperature increase. *Mar. Environ. Res.* S0141–1136 (16), 30171–30174.
- Bruneau, A., Turcotte, P., Pilote, M., Gagné, F., 2015. Fate and immunotoxic effects of silver nanoparticles on rainbow trout in natural waters. *J. Nanomed. Nanotechnol.*, 06. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7439.1000290>.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).
- Canesi, L., Negri, A., Barmo, C., Banni, M., Gallo, G., Viarengo, A., Dondero, F., 2011. The organophosphate chlorpyrifos interferes with the responses to 17β-estradiol in the digestive gland of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One* 6, e19803. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019803>.
- Cardwell, R.D., Deforest, D.K., Brix, K.V., Adams, W.J., 2013. Do Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn biomagnify in aquatic ecosystems? *Rev. Environ. Contam Toxicol.* 226, 101–122.
- Carlson, C., Hussain, S.M., Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L.K., Hess, K.L., Jones, R.L., Schlager, J.J., 2008. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species.
- Çevik, U., Damla, N., Koby, A.I., Bulut, V.N., Duran, C., Dalgic, G., Bozacı, R., 2008. Assessment of metal element concentrations in mussel (*M. Galloprovincialis*) in Eastern Black Sea. *Turk. J. Hazard. Mater.* 160, 396–401. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.010>.
- Chae, M.J., Cheney, D., Su, Y.-C., 2009. Temperature effects on the depuration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from the American oyster (*Crassostrea virginica*). *J. Food Sci.* 74, M62–M66. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01031.x>.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2).
- Claiborne, A., 1985. Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (Ed.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, FL, 283–284.
- Dondero, F., Piacentini, L., Banni, M., Rebelo, M., Burlando, B., Viarengo, A., 2005. Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene* 345, 259–270. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2004.11.031>.
- Dondero, F., Banni, M., Negri, A., Boatti, L., Dagnino, A., Viarengo, A., 2011. Interactions of a pesticide/heavy metal mixture in marine bivalves: a transcriptomic assessment. *BMC Genom.* 12, 195. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-12-195>.
- Dong, G., Chen, H., Qi, M., Dou, Y., Wang, Q., 2015. Balance between metallothionein and metal response element binding transcription factor 1 is mediated by zinc ions. *Mol. Med Res.* 11 (3), 1582–1586.
- Fabrega, J., Luoma, S.N., Tyler, C.R., Galloway, T.S., Lead, J.R., 2011. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ. Int.* 37, 517–531. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2010.10.012>.
- Gagné, F., Auclair, J., Turcotte, P., Gagnon, C., 2013. Sublethal effects of silver nanoparticles and dissolved silver in freshwater mussels. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 76 (8), 479–490.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Pardon, P., Tapie, N., Gourves, P.Y., Budzinski, H., Morin, B., 2016. Combined effects of pollutants and salinity on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar. Environ. Res.* 113, 31–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.11.002>.
- Geffard, O., His, E., Budzinski, H., Seaman, M., Garrigues, P., 2001. Qualité biologique de

- l'eau de mer évaluée in situ par le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*. *Comptes Rendus l'Académie des Sci. - Ser. III - Sci. la Vie* 324, 1149–1155. [http://dx.doi.org/10.1016/S0764-4469\(01\)01396-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0764-4469(01)01396-8).
- Gomes, E.C., Stone, V., Florida-James, G., 2011. Impact of heat and pollution on oxidative stress and CC16 secretion after 8 km run. *Eur. J. Appl. Physiol.* 111, 2089–2097. <http://dx.doi.org/10.1007/s00421-011-1839-x>.
- Gomes, T., Araújo, O., Pereira, R., Almeida, A.C., Cravo, A., Bebianno, M.J., 2013. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 84, 51–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.11.009>.
- Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Sousa, V.S., Teixeira, M.R., Pinheiro, J.P., Bebianno, M.J., 2014. Effects of silver nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 101, 208–214. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.07.004>.
- Gracey, A.Y., Chaney, M.L., Boomhower, J.P., Tyburczy, W.R., Connor, K., Somero, G.N., 2008. Rhythms of gene expression in a fluctuating intertidal environment. *Curr. Biol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2008.08.049>.
- Habig, W., Pabst, M., Jakoby, W., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249 (22), 7130–7139. <http://dx.doi.org/10.14026/j.cnki.0253-9705.2010.23.013>.
- Haynes, D., Loong, D., 2002. Antifoulant (butyltin and copper) concentrations in sediments from the Great Barrier Reef World Heritage Area, Australia. *Environ. Pollut.* 120, 391–396. [http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00113-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00113-6).
- His, E., Beiras, R., Seaman, M.N.L., 1999. The assessment of marine pollution – bioassays with bivalve embryos and larvae. In: *Advances in Marine Biology*, pp. 1–178. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60428-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60428-9).
- Ipcc, 2007. *Climate Change 2007: impacts, adaptation and vulnerability: contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel*. Geneva, Suíça.
- IPCC, 2014. *Summary of Policymakers, Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9781107415324>.
- Jebali, J., Chicano-Gálvez, E., Banni, M., Guerbej, H., Boussetta, H., López-Barea, J., Alhama, J., 2013. Biochemical responses in seabream (*Sparus aurata*) caged in-field or exposed to benzo(a)pyrene and paraquat. Characterization of glutathione S-transferases. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 88, 169–177.
- Kamel, N., Attig, H., Dagnino, A., Boussetta, H., Banni, M., 2012. Increased temperatures affect oxidative stress markers and detoxification response to benzo(a)pyrene exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 534–543. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-012-9790-3>.
- Kuranda, M., Robbins, P., 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266, 19758–19767.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666. [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00060-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00060-1).
- Lockwood, B.L., Sanders, J.G., Somero, G.N., 2010. Transcriptomic responses to heat stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*): molecular correlates of invasive success. *J. Exp. Biol.* 213, 3548–3558. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.046094>.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1), 265–275.
- Luoma, S.N., 2008. *Silver nanotechnologies and the environment: old problems or new challenges?* *Proj. Emerg. Nanotechnol.*, 72.
- Luther, E.M., Schmidt, M.M., Diendorf, J., Epple, M., Dringen, R., 2012. Upregulation of metallothioneins after exposure of cultured primary astrocytes to silver nanoparticles. *Neurochem. Res.* 37, 1639–1648. <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-012-0767-4>.
- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H., Morin, B., 2012. Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2663–2670. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.10.009>.
- Manzl, C., Enrich, J., Ebner, H., Dallinger, R., Krumnabel, G., 2004. Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. *Toxicology* 196, 57–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2003.11.001>.
- McCord, J., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244 (22), 6049–6055.
- Merzendorfer, H., Zimoch, L., 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206, 4393–4412. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.00709>.
- Nadella, S.R., Fitzpatrick, J.L., Franklin, N., Bucking, C., Smith, S., Wood, C.M., 2009. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossulus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 149, 340–348. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.09.001>.
- Negri, A., Oliveri, C., Sforzini, S., Mignione, F., Viarengo, A., Banni, M., 2013. Transcriptional response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) following exposure to heat stress and copper. *PLoS One* 8, e66802. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0066802>.
- O'Brien, A.L., Keough, M.J., 2014. Ecological responses to contamination: a meta-analysis of experimental marine studies. *Environ. Pollut.* 195, 185–191.
- Okoro, H.K., Fatoki, O.S., Adekola, F.A., Ximba, B.J., Snyman, R.G., Opeolu, B., 2011. Reviews of environmental contamination and toxicology volume 213. *Toxicology* 213, 27–54. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-9860-6>.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (rest(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>.
- Pytharopoulou, S., Grintzalis, K., Sazakli, E., Leotsinidis, M., Georgiou, C.D., Kalpaxis, D.L., 2011. Translational responses and oxidative stress of mussels experimentally exposed to Hg, Cu and Cd: one pattern does not fit all. *Aquat. Toxicol.*
- Quiniou, F., His, E., Delesmont, R., Caisey, X., Grouhel, A., Thébaud, M.-J., 2005. Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux: bio-essai « Développement embryo-larvaire de bivalve ». Éd. Ifremer, *Méthodes d'analyse en milieu Mar.*
- Rajagopal, S., Anderson, S., Srajer, V., Schmidt, M., Pahl, R., Moffat, K., 2005. A structural pathway for signaling in the E46Q mutant of photoactive yellow protein. *Structure* 13, 55–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2004.10.016>.
- Reichelt-Brushett, A., Harrison, P., 2005. The effect of selected trace metals on the fertilization success of several scleractinian coral species. *Coral Reefs* 24, 524–534. <http://dx.doi.org/10.1007/s00338-005-0013-5>.
- Ringwood, A.H., 1991. Short term accumulation of cadmium by embryos larvae and adults of an hawaiian bivalve isogonomon californicum. *J. Exp.*, 55–66.
- Skalska, J., Strużyńska, L., 2015. Toxic effects of silver nanoparticles in mammals – does a risk of neurotoxicity exist? *Folia Neuropathol.* 4, 281–300. <http://dx.doi.org/10.5114/fn.2015.56543>.
- Tomanek, Zuzow, 2010. The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance limits and metabolic costs of thermal stress. *J. Exp. Biol.* 213, 3559–3574. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.041228>.
- Verlecar, X.N., Jena, K.B., Chainy, G.B.N., 2007. Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. *Chem. Biol. Interact.* 167, 219–226. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2007.01.018>.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.* 44, 69–84.
- Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F., Marro, A., Fabbri, R., 1999. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers* 4, 455–466. <http://dx.doi.org/10.1080/135475099230615>.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146, 281–300. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.011>.
- Wang, W.-X., Rainbow, P.S., 2005. Influence of metal exposure history on trace metal uptake and accumulation by marine invertebrates. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.01.008>.

Listes des 18 gènes étudiés ainsi que leurs couples d'amorces utilisées

Gene_ID	Probe	Sense Primer	Antisense Primer
cat (AY580271.1)	ACAGCTTGTCTGCTGCTCAGCAC	ACAAGGATGGACAGGCATACTAC	AATCACGGATGGCATAAATCTGGA
gst (AF527010.1)	AGCCTGTGTCCCAACAAGTGG	AACTGACCACCTCAAGAAATAGCC	AGAAAGTCTGCCATTTACAAAGCT
sod(FM177867.1)	AGTCGTCACTGTCACTGCTCTCTC	TGAAAGGAGATGGTGTCTGTTAC	CAAACTCGTGAACGTGGAAAC
hps90 (AJ625915)	ATCAGCTCCAGCTTGAGAGCCTCCATGAA	AAGCTGATCTGGTCAATAACCTGG	AACCTACACCAAACTGTCCAATCA
hsp27 (AJ625244)	CAAAATGCTATAGTCAGCAATTGGTAA	TCTTACTATCCGGGCACCAA	ACACAAGCATCCAAATGCAA
hsp70 (AJ624049)	TCCACCAGCCGACCACGTAGGACA	ACGTTGGTGCTTTGTAGGTCAT	GCCATTGATTTCCGAAACCACG
calreticulin (AJ516886)	CTCCATGTGCCCTCTGAGTGAACCTTGT	TCAGTGATGATCCTAGATTAGGCA	CGTTCTCTCTTTCCCATCTGTAAC
fk506 (AJ625569)	TGTAACCACAACACTCAGAGAGACACC	GATTGCCGAGTTACTGCTGA	TACAGTTTTCGTACTGAACGGAA
catepsin (AJ623463)	TCTCAGCAGACGGACTAAATGCACGT	CCAACAAATCCTTCCCTTAGTACT	ACAGACATTTCCACCAAACTGG
tripsin (AJ516796)	TGTTGCCTGCACCACTCTGTCCGA	GCCAAA TCTTCAGACCAGACAAC	ACCTTCTGTGTAATGTCCCTTGG
mt10 (AJ625847)	-	GGCGCCGACTGTAATGTTC	CACGTTGAAGGYCCTGTACACC
mt-20(HQ681036.1)	-	TGTGAAAGTGGCTGCGGA	GTACAGCCACATCCACACGC
ribol12 (AJ516796)	TGTTGCCTGCACCACTCTGTCCGA	GCCAAA TCTTCAGACCAGACAAC	ACCTTCTGTGTAATGTCCCTTGG
ribos27 (AJ625256)	AACTTTCCACCACGCCGCCATT	AACATATACAGGCAAAAGCACTACA	TCACCATCCGTAATGATAATTGCA
p53 (KC545827.1)	-	AATGTCACAAGCTTCAGTTTCAAC	TAGATGTGATGTTTTGTGTATCCCC
caspase (HQ424451.1)	CCATTCCCTTCAACCTCCTCGCCG	TGCTTTAGCGTTCTGTATCAGTAC	AGCTTTCTGCTGGGAAAAATGAC
dna-ligase (AJ624686.1)	-	CGACAGCCTGAATTGCAGCAG	CTGGGGCTTTCTCTCATGGTTC
topoisomerase (AF227976.1)	-	GCTTCCTTAGCTGTGCTGGT	ACACCATTTCTGGCCAAATC
ribol27 (AJ625928)	TGGGCCATTTCAGCACAAGAATACT	AAGCCATGGCAAAATTTATGAAAA	TTTACAATGACTGCTTTACGACCT
actin (AJ625116)	ACGCCAACACCGTCTTGTGTGGTGG	GTGTGATGTCATATCCGTAAGGA	GCTTGGAGCAAGTGTCTGTA
18S (L33452)	ACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGC	CGGAGAGGAGCATGAGAAAAC	CGTGCCAGGAGTGGGTAATTT

Bibliographie

- Abele, D., Heise, K., Pörtner, H.-O. & Puntarulo, S. (2002). Temperature dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*.
- Adriano, D. C. (2001). *Trace Elements in Terrestrial Environments*, Volume 32.
- AFNOR (2009). AFNOR, X.P.T., 2009. Water Quality e Bioindicator of Potential Toxicity in Aqueous Media e Determination of the Potential Toxicity of Aqueous Samples on Bivalves Embryo-larval Development,. Technical report.
- Agardy, T., Alder, J., Dayton, P., Curran, S., Kitchingman, A., Wilson, M., Catenazzi, A., Restrepo, J., Birkeland, C., Blaber, S., Saifullah, S., Branch, G., Boersma, D., Nixon, S., Dugan, P., Davidson, N. & Vörösmarty, C. (2005). Coastal Systems. *Ecosystems and Human Well-being : Current Status and Trends* (pp. 513–550).
- Akcha, F., Spagnol, C. & Rouxel, J. (2012). Genotoxicity of diuron and glyphosate in oyster spermatozoa and embryos. *Aquatic Toxicology*, 106-107, 104–113.
- Aktepe, N., Kocyigit, A., Yukselten, Y., Taskin, A., Keskin, C. & Celik, H. (2014). Increased DNA Damage and Oxidative Stress Among Silver Jewelry Workers. *Biological Trace Element Research*, 164(2), 185–191.
- Allen, J. D. & Pechenik, J. A. (2010). Understanding the effects of low salinity on fertilization success and early development in the sand dollar *Echinarachnius parma*. *The Biological bulletin*, 218(2), 189–99.
- Alsterberg, C., Sundbäck, K. & Larson, F. (2007). Direct and indirect effects of an antifouling biocide on benthic microalgae and meiofauna. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 351(1-2), 56–72.
- Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J. & Rainbow, P. S. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates : Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 76(2), 160–202.

- 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(1), 87–110.
- Amiard-Triquet, C., Rainglet, F., Larroux, C., Regoli, F. & Hummel, H. (1998). Metallothioneins in Arctic bivalves. *Ecotoxicology and environmental safety*, 41(1), 96–102.
- Anderson, S. L. & Wild, G. C. (1994). Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*, 102(SUPPL. 12), 9–12.
- Anger, k. (2001). *"The Biology of Decapod Crustacean Larvae"*. A. A. Balkema Publishers, Rotterdam.
- Angilletta, M. J., Cooper, B. S., Schuler, M. S. & Boyles, J. G. (2002). The Evolution of Thermal Physiology in Endotherms. *Journal of Thermal Biology*, 2, 249–268.
- Angilletta, Jr., M. J., Huey, R. B. & Frazier, M. R. (2010). Thermodynamic effects on organismal performance : Is hotter better? *Physiological and Biochemical Zoology*, 83(2), 197–206.
- Aniya, Y. & Anders, M. W. (1989). Activation of rat liver microsomal glutathione S-transferase by reduced oxygen species. *The Journal of biological chemistry*, 264(4), 1998–2002.
- Arellano, S. M. & Young, C. M. (2011). Temperature and salinity tolerances of embryos and larvae of the deep-sea mytilid mussel "Bathymodiolus" childressi. *Marine Biology*, 158(11), 2481–2493.
- Arnaudeau, C., Miranda, E. T., Jenssen, D. & Helleday, T. (2000). Inhibition of DNA synthesis is a potent mechanism by which cytostatic drugs induce homologous recombination in mammalian cells. *Mutation Research - DNA Repair*, 461(3), 221–228.
- Arnold, M. L. (1992). Natural Hybridization as an Evolutionary Process. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23(1), 237–261.
- Arnold, M. L. (1997). *Natural hybridization and evolution*, Volume 53.
- Arnold, W. R., Santore, R. C. & Cotsifas, J. S. (2005). Predicting copper toxicity in estuarine and marine waters using the Biotic Ligand Model. *Marine pollution bulletin*, 50(12), 1634–40.

- Arora, S., Balotra, S., Pandey, G. & Kumar, A. (2016). Binary combinations of organophosphorus and synthetic pyrethroids are more potent acetylcholinesterase inhibitors than organophosphorus and carbamate mixtures : An in vitro assessment. *Toxicology Letters*, 268, 8–16.
- Arya, S. K. & Yang, J. T. (1975). Optical rotatory dispersion and circular dichroism of silver(I) :Polyribonucleotide complexes. *Biopolymers*, 14(9), 1847–1861.
- Ashby, J., Tinwell, H., Lefevre, P. A. & Browne, M. A. (1995). The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay) : Measurement of tail length and moment. *Mutagenesis*, 10(2), 85–90.
- Ašmonaitė, G., Boyer, S., de Souza, K. B., Wassmur, B. & Sturve, J. (2016). Behavioural toxicity assessment of silver ions and nanoparticles on zebrafish using a locomotion profiling approach. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 173, 143–53.
- ATSDR (1990). *Toxicological Profile for Silver*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Atlanta, Georgia, USA.
- Attig, H., Kamel, N., Sforzini, S., Dagnino, A., Jamel, J., Boussetta, H., Viarengo, A. & Banni, M. (2014a). Effects of thermal stress and nickel exposure on biomarkers responses in *Mytilus galloprovincialis* (Lam). *Marine Environmental Research*, 94, 65–71.
- Attig, H., Kamel, N., Sforzini, S., Dagnino, A., Jamel, J., Boussetta, H., Viarengo, A. & Banni, M. (2014b). Effects of thermal stress and nickel exposure on biomarkers responses in *Mytilus galloprovincialis* (Lam). *Marine environmental research*, 94, 65–71.
- Attrill, M. & Rundle, S. (2002). Ecotone or ecocline : ecological boundaries in estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 55(6), 929–936.
- Austin, M. a., Wills, K. E., Blizzard, L., Walters, E. H. & Wood-Baker, R. (2010). Effect of high flow oxygen on mortality in chronic obstructive pulmonary disease patients in prehospital setting : randomised controlled trial. *BMJ (Clinical research ed.)*, 341, c5462.
- Ayling, G. M. (1974). Uptake of cadmium, zinc, copper, lead and chromium in the pacific oyster. *Crassostrea gigas*. Grown in the tamar river. Tasmania. *Water Research*, 8(10), 729–738.

- Banakou, E. & Dailianis, S. (2010). Involvement of Na⁺/H⁺ exchanger and respiratory burst enzymes NADPH oxidase and NO synthase, in Cd-induced lipid peroxidation and DNA damage in haemocytes of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 152(3), 346–352.
- Banni, M., Attig, H., Sforzini, S., Oliveri, C., Mignone, F., Boussetta, H. & Viarengo, A. (2014a). Transcriptomic responses to heat stress and nickel in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 148, 104–12.
- Banni, M., Dondero, F., Jebali, J., Guerbej, H., Boussetta, H. & Viarengo, A. (2007). Assessment of heavy metal contamination using real-time PCR analysis of mussel metallothionein mt10 and mt20 expression : a validation along the Tunisian coast. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 12(4), 369–383.
- Banni, M., Hajer, A., Sforzini, S., Oliveri, C., Boussetta, H. & Viarengo, A. (2014b). Transcriptional expression levels and biochemical markers of oxidative stress in *Mytilus galloprovincialis* exposed to nickel and heat stress. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology pharmacology : CBP*, 160, 23–9.
- Banni, M., Negri, A., Mignone, F., Boussetta, H., Viarengo, A. & Dondero, F. (2011). Gene expression rhythms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an annual cycle. *PloS one*, 6(5), e18904.
- Banni, M., Negri, A., Rebelo, M., Rapallo, F., Boussetta, H., Viarengo, A. & Dondero, F. (2009). Expression analysis of the molluscan p53 protein family mRNA in mussels (*Mytilus* spp.) exposed to organic contaminants. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 149(3), 414–418.
- Bar-Ilan, O., Albrecht, R. M., Fako, V. E. & Furgeson, D. Y. (2009). Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 5(16), 1897–910.
- Barriada, J., Herrero, R., Prada-Rodríguez, D. & Sastre de Vicente, M. (2007). Waste spider crab shell and derived chitin as low-cost materials for cadmium and lead removal. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 82, 39–46.
- Barsyte, D., White, K. N. & Lovejoy, D. A. (1999). Cloning and characterization of metallothionein cDNAs in the mussel *Mytilus edulis* L. digestive gland. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology endocrinology*, 122(2), 287–296.

- Barton, N. & Hewitt, G. M. (1985). Analysis of Hybrid Zones. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 16(1985), 113–148.
- Bassett, A. R., Tibbit, C., Ponting, C. P. & Liu, J.-L. (2013). Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell reports*, 4(1), 220–8.
- Bat, L., Akbulut, M., Culha, M., Gundogdu, A. & Satilmis, H. H. (2000). Effect of Temperature on the Toxicity of Zinc, Copper and Lead to the Freshwater Amphipod *Gammarus pulex pulex* (L., 1758). *Turkish Journal of Zoology*, 24, 409–415.
- Baudrimont, M., Lemaire-Gony, S., Ribeyre, F., Metivaud, J. & Boudou, A. (1997). Seasonal variations of metallothionein concentrations in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 118(3), 361–367.
- Baudrimont, M., de Montaudouin, X. & Palvadeau, A. (2006). Impact of digenean parasite infection on metallothionein synthesis by the cockle (*Cerastoderma edule*) : A multivariate field monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 52(5), 494–502.
- Bax, N., Carlton, J. T., Mathews-Amos, a., Haedrich, R. L., Howarth, F. G., Purcell, J. E., Rieser, a. & Gray, a. (2001). The Control of Biological Invasions in the World ' s Oceans. *Conservation Biology*, 15(5), 1234–1246.
- Bayne, B. (1965). Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia*, 2(1), 1–47.
- Bayne, B. L., Holland, D. L., Moore, M. N., Lowe, D. M. & Widdows, J. (1978). Further studies on the effects of stress in the adult on the eggs of *Mytilus edulis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 58(04), 825.
- Beaumont, A. R., Turner, G., Wood, A. R. & Skibinski, D. O. (2004). Hybridisations between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* and performance of pure species and hybrid veliger larvae at different temperatures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 302(2), 177–188.
- Bebianno, M. J., Company, R., Serafim, A., Camus, L., Cosson, R. P. & Fiala-Médoni, A. (2005). Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquatic Toxicology*, 75(4), 354–373.

- Bebianno, M. J. & Langston, W. J. (1998). Cadmium and metallothionein turnover in different tissues of the gastropod *Littorina littorea*. In *Talanta*, Volume 46 (pp. 301–313).
- Bebianno, M. J. & Machado, L. M. (1997). Concentrations of metals and metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the south coast of Portugal. *Marine Pollution Bulletin*, 34(8), 666–671.
- Behra, R., Sigg, L., Clift, M. J. D., Herzog, F., Minghetti, M., Johnston, B., Petri-Fink, A. & Rothen-Rutishauser, B. (2013). Bioavailability of silver nanoparticles and ions : from a chemical and biochemical perspective. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 10(87), 20130396.
- Behrens, D., Rouxel, J., Burgeot, T. & Akcha, F. (2016). Comparative embryotoxicity and genotoxicity of the herbicide diuron and its metabolites in early life stages of *Crassostrea gigas* : Implication of reactive oxygen species production. *Aquatic Toxicology*, 175, 249–259.
- Beiras, R. (2002). Comparison of methods to obtain a liquid phase in marine sediment toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* sea urchin embryos. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(1), 23–28.
- Beiras, R. & Albentosa, M. (2004). Inhibition of embryo development of the commercial bivalves *Ruditapes decussatus* and *Mytilus galloprovincialis* by trace metals ; implications for the implementation of seawater quality criteria. *Aquaculture*, 230(1-4), 205–213.
- Beiras, R. & His, E. (1995). Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival and growth of *Mytilus galloprovincialis* mussel larvae. *Marine Ecology Progress Series*, 126, 185–189.
- Belfiore, N. M. & Anderson, S. L. (2001). Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms : A review. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 489(2-3), 97–122.
- Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W. & Courchamp, F. (2012). Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology letters*, 15(4), 365–77.
- Berhane, K., Widersten, M., Engström, a., Kozarich, J. W. & Mannervik, B. (1994). Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(4), 1480–1484.

- Bertoncini, C. R. A. & Mene, R. (1995). DNA strand breaks produced by oxidative stress in mammalian cells exhibit 3-phosphoglycolate termini. *Nucleic Acids Research*, 23(15), 2995–3002.
- Bhaby, S. (2015). Synchronous Reproduction in Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) Population from Atlantic Ocean of. *Journal of Aquaculture Marine Biology Synchronous*, 2(4), 00031.
- Bianchini, A., Playle, R. C., Wood, C. M. & Walsh, P. J. (2005). Mechanism of acute silver toxicity in marine invertebrates. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 72, 67–82.
- Bielmyer, G. K., Brix, K. V., Capo, T. R. & Grosell, M. (2005). The effects of metals on embryo-larval and adult life stages of the sea urchin, *Diadema antillarum*. *Aquatic Toxicology*, 74(3), 254–263.
- Bielmyer, G. K., Brix, K. V. & Grosell, M. (2008). Is Cl⁻ protection against silver toxicity due to chemical speciation? *Aquatic Toxicology*, 87(2), 81–87.
- Bierne, N., Borsa, P., Daguin, C., Jollivet, D., Viard, F., Bonhomme, F. & David, P. (2003). Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Molecular Ecology*, 12(2), 447–461.
- Bisson, M., Houeix, N., Gay, G., Lacroix, G., Lefevre, J., Magaud, H., Migne, V., Morin, A., Tissot, S. & Gillet, C. (2005). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques - Cuivre et ses dérivés. *Ineris* (pp. 1–66).
- Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D. & Regoli, F. (2008). Contaminant accumulation and biomarker responses in caged mussels, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquatic Toxicology*, 89(4), 257–266.
- Bolognesi, C., Landini, E., Roggeri, P., Fabbri, R. & Viarengo, A. (1999). Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels : Experimental studies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 33(4), 287–292.
- Bonansea, R. I., Wunderlin, D. A. & Amé, M. V. (2016). Behavioral swimming effects and acetylcholinesterase activity changes in *Jenynsia multidentata* exposed to chlorpyrifos and cypermethrin individually and in mixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 129, 311–319.

- Bonnard, M., Roméo, M. & Amiard-Triquet, C. (2009). Effects of Copper on the Burrowing Behavior of Estuarine and Coastal Invertebrates, the Polychaete *Nereis diversicolor* and the Bivalve *Scrobicularia plana*. *Human and Ecological Risk Assessment*.
- Boulanger, B., Vargo, J. D., Schnoor, J. L. & Hornbuckle, K. C. (2005). Evaluation of Perfluorooctane Surfactants in a Wastewater Treatment System and in a Commercial Surface Protection Product. *Environmental Science Technology*, 39(15), 5524–5530.
- Bowen, R. E. & Depledge, M. H. (2006). Rapid Assessment of Marine Pollution (RAMP). *Marine Pollution Bulletin*, 53(10-12), 631–639.
- Bozinovic, G. & Oleksiak, M. F. (2011). Genomic approaches with natural fish populations from polluted environments. *Environmental toxicology and chemistry*, 30(2), 283–9.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254.
- Bradl, H. B. (2005). *Heavy Metals in the Environment : Origin, Interaction and Remediation*. Elsevier/Academic Press, London.
- Brenko, M. & Calabrese, a. (1969). The combined effects of salinity and temperature on larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 4, 224–226.
- Brewer, S. K., Little, E. E., DeLonay, A. J., Beauvais, S. L., Jones, S. B. & Ellersieck, M. R. (2001). Behavioral dysfunctions correlate to altered physiology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cholinesterase-inhibiting chemicals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40(1), 70–76.
- Brierley, A. S. & Kingsford, M. J. (2009). Impacts of climate change on marine organisms and ecosystems. *Current biology : CB*, 19(14), R602–14.
- Briggs, J. C. (1994). Species Diversity : Land and Sea Compared. *Oxford University Press for the Society of Systematic Biologists*, 43(1), 130–135.
- Broderius, S., Kahl, M. & Hoglund, M. (1995). Use of joint toxic response to define the primary mode of toxic action for diverse industrial organic chemicals. *Env. Toxicol. Chem.*, 14, 1591–1605.
- Brooks, S. J., Bolam, T., Tolhurst, L., Bassett, J., Roche, J. L., Waldock, M., Barry, J. & Thomas, K. V. (2007). Effects of Dissolved Organic Carbon on the

- Toxicity of Copper To the Developing Embryos of the Pacific Oyster (*Crassostrea Gigas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(8), 1756–1763.
- Brown, R. J., Galloway, T. S., Lowe, D., Browne, M. A., Dissanayake, A., Jones, M. B. & Depledge, M. H. (2004). Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 66(3), 267–278.
- Bruneau, A., Turcotte, P., Pilote, M. & Gagné, F. (2015). Fate and Immunotoxic Effects of Silver Nanoparticles on Rainbow Trout in Natural Waters. *Journal of Nanomedicine Nanotechnology*, 06(03).
- Bryan, G. W. (1984). Pollution due to heavy metals and their compounds. *Mar. Ecol.*, 5, 1290–1431.
- Bryan, G. W. & Langston, W. J. (1992). Bioavailability, Accumulation and Effects of Heavy-Metals in Sediments with Special Reference to United-Kingdom Estuaries - a Review. *Environmental Pollution*, 76(2), 89–131.
- Buege, J. A. & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52(C), 302–310.
- Buffet, P. E., Tankoua, O. F., Pan, J. F., Berhanu, D., Herrenknecht, C., Poirier, L., Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C., Berard, J. B., Risso, C., Guibbolini, M., Roméo, M., Reip, P., Valsami-Jones, E. & Mouneyrac, C. (2011). Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere*, 84(1), 166–174.
- Burcham, P. C. (1999). Internal hazards : Baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism.
- Burke, L., Kura, Y., Kassem, K., Revenga, C., Spalding, M. & McAllister, D. (2001). *Coastal Zone : Extent and Change*.
- Burrue, V., Klooster, K., Barker, C. M., Pera, R. R. & Meyers, S. (2014). Abnormal early cleavage events predict early embryo demise : sperm oxidative stress and early abnormal cleavage. *Scientific reports*, 4, 6598.
- Burton, T. & Metcalfe, N. B. (2014). Can environmental conditions experienced in early life influence future generations? *Proceedings. Biological sciences*, 281(1785), 20140311.
- Buschini, A., Carboni, P., Martino, A., Poli, P. & Rossi, C. (2003). Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes

- of *Dreissena polymorpha*. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 537(1), 81–92.
- Byrne, M. (2011). Impact of ocean warming and ocean acidification on marine invertebrate life history stages : vulnerabilities and potential for persistence in a changing ocean. *Oceanography and Marine Biology : An Annual Review*, 49, 1–42.
- Byrne, M. & Przeslawski, R. (2013). Multistressor impacts of warming and acidification of the ocean on marine invertebrates' life histories. *Integrative and comparative biology*, 53(4), 582–96.
- Caceres-Martinez, J., Robledo, J. A. F. & Figueras, A. (1993). Settlement of mussels *Mytilus galloprovincialis* on an exposed rocky shore in Ria de Vigo, NW Spain.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M. H., Pottier, D. & Budzinski, H. (2006). Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology*, 79(3), 257–267.
- Cairns, J. & Gruber, D. (1980). A COMPARISON OF METHODS AND INSTRUMENTATION OF BIOLOGICAL EARLY WARNING SYSTEMS. *Journal of the American Water Resources Association*, 16(2), 261–266.
- Cairns, J., Heath, a. G. & Parker, B. C. (1975). Temperature influence on chemical toxicity to aquatic organisms. *Journal - Water Pollution Control Federation*, 47(2), 267–280.
- Calabrese, A. & Davis, H. (1967). Effects of "soft" detergents on embryos and larvae of the american oyster *Crassostrea virginica*. *Proceedings of the national shellfisheries association*, 57.
- Calabrese, A., MacInnes, J. R., Nelson, D. A. & Miller, J. E. (1977). Survival and growth of bivalve larvae under heavy-metal stress. *Marine Biology*, 41(2), 179–184.
- Callaway, R., Shinn, A. P., Grenfell, S. E., Bron, J. E., Burnell, G., Cook, E. J., Crumlish, M., Culloty, S., Davidson, K., Ellis, R. P., Flynn, K. J., Fox, C., Green, D. M., Hays, G. C., Hughes, A. D., Johnston, E., Lowe, C. D., Lupatsch, I., Malham, S., Mendzil, A. F., Nickell, T., Pickerell, T., Rowley, A. F., Stanley, M. S., Tocher, D. R., Turnbull, J. F., Webb, G., Wootton, E. & Shields, R. J. (2012). Review of climate change impacts on marine aquaculture in the UK

- and Ireland. *Aquatic Conservation : Marine and Freshwater Ecosystems*, 22(3), 389–421.
- Calmon, P., Garnier-Laplace, J. & Fortin, C. (2002). Fiche radionucléide argent 110m et environnement (p.15).
- Canesi, L., Negri, A., Barmo, C., Banni, M., Gallo, G., Viarengo, A. & Dondero, F. (2011). The organophosphate Chlorpyrifos interferes with the responses to 17 β -estradiol in the digestive gland of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS one*, 6(5), e19803.
- Carlson, C., Hussain, S. M., Schrand, A. M., Braydich-Stolle, L. K., Hess, K. L., Jones, R. L. & Schlager, J. J. (2008). Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles : Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species.
- Carriker, M. (1961). Interrelation of functional morphology, behaviour, and autecology in early stages of the bivalve *Mercenaria mercenaria*. *J Elisha Mitchell Sci Soc*, 77, 168–241.
- Cevik, U., Damla, N., Kobya, A. I., Bulut, V. N., Duran, C., Dalgic, G. & Bozaci, R. (2008). Assessment of metal element concentrations in mussel (*M. Galloprovincialis*) in Eastern Black Sea, Turkey. *Journal of Hazardous Materials*, 160(2-3), 396–401.
- Chae, M. J., Cheney, D. & Su, Y.-C. (2009). Temperature effects on the depuration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Journal of food science*, 74(2), M62–6.
- Charehsaz, M., Hougaard, K. S., Sipahi, H., Ekici, A. I. D., Kaspar, C., Culha, M., Bucurgat, U. U. & Aydin, A. (2016). Effects of developmental exposure to silver in ionic and nanoparticle form : A study in rats. *Daru-Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, 1–13.
- Chen, I., Hill, J., Ohlemüller, R., Roy, D. & Thomas, C. (2011). Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming. *Science*, 333(6045), 1024–1026.
- Chester, R., Thomas, A., Lin, F. J., Basaham, A. S. & Jacinto, G. (1988). The solid state speciation of copper in surface water particulates and oceanic sediments. *Marine Chemistry*, 24(3-4), 261–292.
- Chiffolleau, J.-F., Auger, D., Chartier, E., Michel, P., Truquet, I., Ficht, A., Gonzalez, J.-L. & Romana, L.-A. (2001). Spatiotemporal Changes in Cadmium Contamination in the Seine Estuary (France). *Estuaries*, 24(6), 1029.

- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156–159.
- Chowdhury, M. J., Girgis, M. & Wood, C. M. (2016). Revisiting the mechanisms of copper toxicity to rainbow trout : Time course, influence of calcium, unidirectional Na⁺ fluxes, and branchial Na⁺, K⁺ ATPase and V-type H⁺ ATPase activities. *Aquatic Toxicology*, *177*, 51–62.
- Chown, S. L. & Nicolson, S. (2004). Insect Physiological Ecology : Mechanisms and Patterns. *Biology* (p. 254).
- Chown, S. L. & Terblanche, J. S. (2006). Physiological Diversity in Insects : Ecological and Evolutionary Contexts.
- Claiborne, A. (1985). Catalase activity R.A. Greenwald (Ed.). *Handbook of Methods for Oxygen Research*, CRC Press, Boca Raton, FL (pp. 283–284).
- Claisse, D. & Alzieu, C. (1993). Copper contamination as a result of antifouling paint regulations? *Marine Pollution Bulletin*, *26*(7), 395–397.
- Clarke, A. (2003). Costs and consequences of evolutionary temperature adaptation. *Trends in Ecology Evolution*, *18*(11), 573–581.
- Clement, J. L. & Jarrett, P. S. (1994). Antibacterial silver. *Met Based Drugs*, *1*((5-6)), 467–482.
- Cleveland, M., Kalamas, M. & Laroche, M. (2005). Shades of green : linking environmental locus of control and pro-environmental behaviors. *Journal of Consumer Marketing*, *22*(4), 198–212.
- Coelho, S. M., Godfroy, O., Arun, A., Le Corguillé, G., Peters, A. F. & Cock, J. M. (2011). OUROBOROS is a master regulator of the gametophyte to sporophyte life cycle transition in the brown alga *Ectocarpus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(28), 11518–23.
- Coglianesi, M. & Martin, M. (1981). Individual and interactive effects of environmental stress on the embryonic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. The toxicity of copper and silver. *Marine Environmental Research*, *5*(1), 13–27.
- Collins, A. R., Dušinská, M., Gedik, C. M. & Štětina, R. (1996). Oxidative damage to DNA : Do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives*, *104*(SUPPL. 3), 465–469.

- Cooper, N. L. & Bidwell, J. R. (2006). Cholinesterase inhibition and impacts on behavior of the Asian clam, *Corbicula fluminea*, after exposure to an organophosphate insecticide. *Aquatic Toxicology*, 76(3-4), 258–267.
- Coors, A. & De Meester, L. (2008). Synergistic, antagonistic and additive effects of multiple stressors : predation threat, parasitism and pesticide exposure in *Daphnia magna*. *Journal of Applied Ecology*, 45(6), 1820–1828.
- Coskun, D., Britto, D. T., Jean, Y. K., Schulze, L. M., Becker, A. & Kronzucker, H. J. (2012). Silver ions disrupt K + homeostasis and cellular integrity in intact barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Journal of Experimental Botany*, 63(1), 151–162.
- Cossi, P. F., Beverly, B., Carlos, L. & Kristoff, G. (2015). Recovery study of cholinesterases and neurotoxic signs in the non-target freshwater invertebrate *Chilina gibbosa* after an acute exposure to an environmental concentration of azinphos-methyl. *Aquatic Toxicology*, 167, 248–256.
- Cosson, R. P., Thiébaud, É., Company, R., Castrec-Rouelle, M., Colaço, A., Martins, I., Sarradin, P. M. & Bebianno, M. J. (2008). Spatial variation of metal bioaccumulation in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Marine Environmental Research*, 65(5), 405–415.
- Cossu, G., De Angelis, L., Borello, U., Berarducci, B., Buffa, V., Sonnino, C., Coletta, M., Vivarelli, E., Bouche', M., Lattanzi, L., Tosoni, D., Di Donna, S., Berghella, L., Salvatori, G., Murphy, P., Cusella-De Angelis, M. G. & Molinaro, M. (2000). Determination, diversification and multipotency of mammalian myogenic cells. *International Journal of Developmental Biology*, 44(6), 699–706.
- Costanza, R., Arge, R., Groot, R. D., Farberk, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R. V., Paruelo, J., Raskin, R. G., Suttonk, P. & van den Belt, M. (1997). The value of the world ' s ecosystem services and natural capital. *Nature*, 387(May), 253–260.
- Coustau, C., Renaud, F. & Delay, B. (1991). Genetic characterization of the hybridization between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* on the Atlantic coast of France. *Marine Biology*, 111(1), 87–93.
- Cowen, R. K. & Sponaugle, S. (2009). Larval Dispersal and Marine Population Connectivity. *Annu. Rev. Mar. Sci*, 1, 443–66.
- Crean, A. J., Dwyer, J. M. & Marshall, D. J. (2013). Adaptive paternal effects? Experimental evidence that the paternal environment affects offspring performance. *Ecology*, 94(11), 2575–2582.

- Crossland, C., Kremer, H., Lindeboom, H., Marshall, J. & Tissier, M. L. (2005). *Coastal fluxes in the Anthropocene*.
- Crow, T. & Alkon, D. (1978). Retention of an associative behavioral change in *Hermisenda*. *Science*, *201*(4362), 1239–1241.
- Damiens, G., His, E., Gnassia-Barelli, M., Quiniou, F. & Roméo, M. (2004). Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology pharmacology : CBP*, *138*(2), 121–8.
- Daskalakis, K. D. (1996). Variability of metal concentrations oyster tissue and implications to biomonitoring. *Marine Pollution Bulletin*, *32*(11), 794–801.
- Dattagupta, N. & Crothers, D. M. (1981). Solution structural studies of the Ag(I)-DNA complex. *Nucleic Acids Research*, *9*(12), 2971–2985.
- Davidson, E. H. (1991). Spatial mechanisms of gene regulation in metazoan embryos. *Development (Cambridge, England)*, *113*(1), 1–26.
- Davoren, G. K., Penton, P., Burke, C. & Montevecchi, W. a. (2012). Water temperature and timing of capelin spawning determine seabird diets. *ICES Journal of Marine Science*, *69*(7), 1234–1241.
- De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Müller, A., Ruiz-Ramirez, L., Howarth, J. A. & Dobrota, M. (2003). Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent : Casiopeina II. *Toxicology*, *194*(1-2), 103–113.
- Deb, S. C. & Fukushima, T. (2007a). Metals in aquatic ecosystems : mechanisms of uptake, accumulation and release-Ecotoxicological perspectives. *International Journal of Environmental Studies*, *56*(3), 385–417.
- Deb, S. C. & Fukushima, T. (2007b). Metals in aquatic ecosystems : mechanisms of uptake, accumulation and release-Ecotoxicological perspectives. *International Journal of Environmental Studies*, *56*(3), 385–417.
- Depledge, M. H. (1989). Studies on copper and iron concentrations, distributions and uptake in the brachyuran *Carcinus maenas* (L.) following starvation. *Opheelia*, *30*(3), 187–197.
- Depledge, M. H. (1998). The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *399*(1), 109–122.

- Depledge, M. H. & Fossi, M. C. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology (London, England)*, 3(3), 161–172.
- Depledge, M. H. & Rainbow, P. S. (1990). Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates.
- Deruytter, D., Vandegheuchte, M. B., Garrevoet, J., De Laender, F., Vergucht, E., Delbeke, K., Blust, R., De Schamphelaere, K. A. C., Vincze, L. & Janssen, C. R. (2015). Salinity and dissolved organic carbon both affect copper toxicity in mussel larvae : Copper speciation or competition cannot explain everything. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(6), 1330–1336.
- Devieux, B., Chassoux, F., Landre, E., Turak, B., Daumas-Duport, C., Chagot, D., Gagnepain, J. P. & Chodkiewicz, J. P. (1997). Chronic intractable epilepsy associated with a tumor located in the central region : functional mapping data and postoperative outcome. *Stereotactic and functional neurosurgery*, 69(1-4 Pt 2), 229–238.
- Devi, M. & Fingerman, M. (1995). Inhibition of acetylcholinesterase activity in the central nervous system of the red swamp crayfish, *procambarus clarkii*, by mercury, cadmium, and lead. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 55(5), 746–750.
- Devi, M., Thomas, D. A., Barber, J. T. & Fingerman, M. (1996). Accumulation and physiological and biochemical effects of cadmium in a simple aquatic food chain. *Ecotoxicology and environmental safety*, 33(1), 38–43.
- Di Poi, C., Evariste, L., Serpentine, A., Halm-Lemeille, M. P., Lebel, J. M. & Costil, K. (2013). Toxicity of five antidepressant drugs on embryo-larval development and metamorphosis success in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Diamantino, T. C., Almeida, E., Soares, A. M. V. M. & Guilhermino, L. (2003). Characterization of cholinesterases from *Daphnia magna* straus and their inhibition by zinc. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71(2), 219–225.
- Diamond, J. M., Parson, M. J. & Gruber, D. (1990). Rapid detection of sublethal toxicity using fish ventilatory behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(1), 3–11.
- Dias, M. I., Prudencio, M. I., Gouveia, M. A., Trindade, M. J., Marques, R., Franco, D., Raposo, J., Fabiao, C. S. & Guerra, A. (2009). Chemical tracers

- of Lusitanian amphorae kilns from the Tagus estuary (Portugal). *Journal of Archaeological Science*, 37(4), 784–798.
- Diehl, F., Ramos, P. B., Dos Santos, J. M., Barros, D. M. & Yunes, J. S. (2016). Behavioral alterations induced by repeated saxitoxin exposure in drinking water. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 22, 18.
- Diekmann, M., Waldmann, P., Schnurstein, A., Grummt, T., Braunbeck, T. & Nagel, R. (2004). On the relevance of genotoxicity for fish populations II : Genotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test. *Aquatic Toxicology*, 68(1), 27–37.
- Dimitriadis, V. K., Gougoula, C., Anestis, A., Pörtner, H. O. & Michaelidis, B. (2012). Monitoring the biochemical and cellular responses of marine bivalves during thermal stress by using biomarkers. *Marine Environmental Research*, 73, 70–77.
- Dinnel, P., Stober, Q., Link, J Letourneau, M., Roberts, W., Felton, S. & Nakatani, R. (1983). Methodology and validation of a sperm cell toxicity test for testing toxic substances in marine waters. Final Report. Grant R/TOX. FRI-UW-83. University of Washington Sea Grant Program in cooperation with U. S. Environmental Protection Agency. Technical report.
- Directive 2000/60/EC (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Technical report.
- Directive 2008/56/EC (2008). Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council of 17 June 2008 establishing a framework for community action in the field of environment al policy (Marine Strategy Framework Directive). Technical report.
- Directive 2010/63/UE (2010). DIRECTIVES :Pour La Science De Demain. Technical report.
- DiRico, D. E., Keller, P. B. & Hartman, K. A. (1985). The infrared spectrum and structure of the type I complex of silver and DNA. *Nucleic Acids Research*, 13(1), 251–260.
- Dixon, D. R. (2002). Marine invertebrate eco-genotoxicology : a methodological overview. *Mutagenesis*, 17(6), 495–507.
- Dobalian, L. (2000). "Shelter Island Yacht Basin TMDL for Dissolved Copper" California Regional Water Quality Control Board. Technical report.

- Dodson, S. I. & Hanazato, T. (1995). Commentary on effects of anthropogenic and natural organic chemicals on development, swimming behavior, and reproduction of *Daphnia*, a key member of aquatic ecosystems. *Environmental Health Perspectives*, 103(SUPPL. 4), 7–11.
- Dolbeth, M., Cardoso, P. G., Grilo, T. F., Bordalo, M. D., Raffaelli, D. & Pardal, M. A. (2011). Long-term changes in the production by estuarine macrobenthos affected by multiple stressors. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 92(1), 10–18.
- Dondero, F., Piacentini, L., Banni, M., Rebelo, M., Burlando, B. & Viarengo, A. (2005). Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene*, 345(2), 259–270.
- Doney, S. C. (2010). The growing human footprint on coastal and open-ocean biogeochemistry. *Science*, 328(5985), 1512–1516.
- Doney, S. C., Fabry, V. J., Feely, R. A. & Kleypas, J. A. (2008). Ocean Acidification : The Other CO₂ Problem. *Annual Review of Marine Science*, 1(1), 169–192.
- Dorts, J., Falisse, E., Schoofs, E., Flamion, E., Kestemont, P. & Silvestre, F. (2016). DNA methyltransferases and stress-related genes expression in zebrafish larvae after exposure to heat and copper during reprogramming of DNA methylation. *Scientific Reports*, 6(October), 34254.
- Dove, M. C. & Connor, W. A. O. (2007). Salinity and Temperature Tolerance of Sydney Rock Oysters *Saccostrea Glomerata* During Early Ontogeny. *Journal of Shellfish Research*, 26(4), 939–947.
- Durrieu de Madron, X., Guieu, C., Sempéré, R., Conan, P., Cossa, D., D’Ortenzio, F., Estournel, C., Gazeau, F., Rabouille, C., Stemmann, L., Bonnet, S., Diaz, F., Koubbi, P., Radakovitch, O., Babin, M., Baklouti, M., Bancon-Montigny, C., Belviso, S., Bensoussan, N., Bonsang, B., Bouloubassi, I., Brunet, C., Cadiou, J. F., Carlotti, F., Chami, M., Charmasson, S., Charrière, B., Dachs, J., Doxaran, D., Dutay, J. C., Elbaz-Poulichet, F., Eléaume, M., Eyrolles, F., Fernandez, C., Fowler, S., Francour, P., Gaertner, J. C., Galzin, R., Gasparini, S., Ghiglione, J. F., Gonzalez, J. L., Goyet, C., Guidi, L., Guizien, K., Heimbürger, L. E., Jacques, S. H. M., Jeffrey, W. H., Joux, F., Le Hir, P., Leblanc, K., Lefèvre, D., Lejeusne, C., Lemé, R., Loÿe-Pilot, M. D., Mallet, M., Méjanelle, L., Mélin, F., Mellon, C., Mérigot, B., Merle, P. L., Migon, C., Miller, W. L., Mortier, L., Mostajir, B., Mousseau, L., Moutin, T., Para, J., Pérez, T., Petrenko, A., Poggiale, J. C., Prieur, L., Pujo-Pay, M., Pulido-Villena, Raimbault, P., Rees, A. P., Ridade, C., Rontani, J. F., Ruiz Pino, D., Sicre, M. A., Taillandier, V., Tamburini,

- C., Tanaka, T., Taupier-Letage, I., Tedetti, M., Testor, P., Thébault, H., Thouvenin, B., Touratier, F., Tronczynski, J., Ulses, C., Van Wambeke, F., Vantrepotte, V., Vaz, S. & Verney, R. (2011). Marine ecosystems' responses to climatic and anthropogenic forcings in the Mediterranean. *Progress in Oceanography*, 91(2), 97–166.
- Einfluss, M., Göbel, J., Lu, D. & Voß, J. (2004). Potential impact of climate change on marine phytoplankton with emphasis on the German coastal waters and the East China Sea (pp. 75–82).
- Eisler, R. (1988). *MERCURY HAZARDS TO FISH , WILDLIFE , AND INVERTEBRATES : A SYNOPTIC REVIEW* by, Volume 85.
- El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75(4), 817–825.
- Elliott, M. & Whitfield, A. K. (2011). Challenging paradigms in estuarine ecology and management. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 94(4), 306–314.
- Elliott, M., Whitfield, A. K., Potter, I. C., Blaber, S. J. M., Cyrus, D. P., Nordlie, F. G. & Harrison, T. D. (2007). The guild approach to categorizing estuarine fish assemblages : a global review. *Fish and Fisheries*, 8(3), 241–268.
- Ellman, G. L., Courtney, K., Andres, V. & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95.
- Epel, D. (2003). Protection of DNA during early development : adaptations and evolutionary consequences. *Evolution and Development*, 5(1), 83–88.
- Erickson, R. J., Benoit, D. a., Mattson, V. R., Leonard, E. N. & Nelson, H. P. (1996). The effects of water chemistry on the toxicity of copper to fathead minnows. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(2), 181–193.
- European Environment Agency (1995). *Europe's Environment - The Dobbris Assessment* (Copenhagen Ed.).
- Fabbri, E., Valbonesi, P. & Franzellitti, S. (2008). HSP expression in bivalves. *Invertebrate Survival Journal* (pp. 135–161).
- Fabbri, R., Montagna, M., Balbi, T., Raffo, E., Palumbo, F. & Canesi, L. (2014a). Adaptation of the bivalve embryotoxicity assay for the high throughput screening of emerging contaminants in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 99, 1–8.

- Fabbri, R., Montagna, M., Balbi, T., Raffo, E., Palumbo, F. & Canesi, L. (2014b). Adaptation of the bivalve embryotoxicity assay for the high throughput screening of emerging contaminants in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, *99*, 1–8.
- Fabrega, J., Luoma, S. N., Tyler, C. R., Galloway, T. S. & Lead, J. R. (2011). Silver nanoparticles : Behaviour and effects in the aquatic environment.
- Faggio, C., Pagano, M., Alampi, R., Vazzana, I. & Felice, M. R. (2016). Cytotoxicity, haemolympatic parameters, and oxidative stress following exposure to sub-lethal concentrations of quaternium-15 in *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, *180*, 258–265.
- Falkowski, P. G. (1998). Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science*, *281*(5374), 200–206.
- FAO (2015). Fisheries and aquaculture software. FishStatJ — software for fishery statistical time series. FAO Fisheries and Aquaculture Department [online] Rome. Technical report.
- Farcy, E., Fleury, C., Lelong, C., Dubos, M. P., Voiseux, C., Fiévet, B. & Lebel, J. M. (2008). Molecular cloning of a new member of the p53 family from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and seasonal pattern of its transcriptional expression level. *Marine Environmental Research*, *66*(2), 300–308.
- Fernández, N. & Beiras, R. (2001). Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the Paracentrotus lividus sea-urchin. *Ecotoxicology*, *10*(5), 263–271.
- Fernández-mejía, C. (2013). Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions. *Agricultural and Biological Sciences* (pp. 209–232).
- Fischer, K. & Karl, I. (2010). Exploring plastic and genetic responses to temperature variation using copper butterflies. *Climate Research*, *43*(1-2), 17–30.
- Fisher, N. S., Breslin, V. T. & Levandowsky, M. (1995). Accumulation of silver and lead in estuarine microzooplankton. *Marine Ecology Progress Series*, *116*(1-3), 207–216.
- Fitzpatrick, J. L., Nadella, S., Bucking, C., Balshine, S. & Wood, C. M. (2008). The relative sensitivity of sperm, eggs and embryos to copper in the blue mussel (*Mytilus trossulus*). *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology pharmacology : CBP*, *147*(4), 441–9.

- Flemming, C. A. & Trevors, J. T. (1989). Copper toxicity and chemistry in the environment : a review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 44(1-2), 143–158.
- Floyd, E. Y., Geist, J. P. & Werner, I. (2008). Acute, sublethal exposure to a pyrethroid insecticide alters behavior, growth, and predation risk in larvae of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental toxicology and chemistry*, 27(8), 1780–87.
- Forget, J., Beliaeff, B. & Bocquené, G. (2003). Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquatic Toxicology*, 62(3), 195–204.
- Franco, A., Franzoi, P. & Torricelli, P. (2008). Structure and functioning of Mediterranean lagoon fish assemblages : A key for the identification of water body types. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 79(3), 549–558.
- Frasco, M. F., Fournier, D., Carvalho, F. & Guilhermino, L. (2005). Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE) ? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 10(5), 360–75.
- Frazier, J. M. (1986). Cadmium-binding proteins in the mussel, *Mytilus edulis*. *Environmental Health Perspectives*, VOL. 65, 39–43.
- Freeman, M., Dobritsa, A., Gaines, P., Segraves, W. & Carlson, J. (1999). The dare gene : steroid hormone production, olfactory behavior, and neural degeneration in *Drosophila*. *Development*, 126(20), 4591–4602.
- Gaitán-Espitia, J. D., Quintero-Galvis, J. F., Mesas, A. & D'Elía, G. (2016). Mitogenomics of southern hemisphere blue mussels (*Bivalvia : Pteriomorphia*) : Insights into the evolutionary characteristics of the *Mytilus edulis* complex. *Scientific Reports*, 6(April), 26853.
- Gamain, P. (2016). Impact des polluants et du changement climatique sur les capacités de reproduction et le développement embryonnaire larvaire de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans le Bassin d'Arcachon (p. 342).
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Clérendean, C., Budzinski, H., Mazella, N., Martin, C., Gourves, P. Y. & Morin, B. (2016a). Influence of the combined effects of temperature and pollutants on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *En préparation*.
- Gamain, P., Gonzalez, P., Cachot, J., Pardon, P., Tapie, N., Gourves, P. Y., Budzinski, H. & Morin, B. (2016b). Combined effects of pollutants and salinity

- on embryo-larval development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine environmental research*, 113, 31–8.
- Gambaiani, D., Mayol, P., Isaac, S. & Simmonds, M. (2009). Potential impacts of climate change and greenhouse gas emissions on Mediterranean marine ecosystems and cetaceans. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89(01), 179.
- Gardner, J. (1997). *Advances in Marine Biology Volume 31*, Volume 31.
- Gardner, J., Skibinski, D. & Bajdik, C. D. (1993). Shell Growth and Viability Differences Between the Marine Mussels *Mytilus edulis* (L.), *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.), and Their Hybrids From Two Sympatric Populations in S.W. England. *The Biological Bulletin*, 185(3), 405–416.
- GARRABOU, J., COMA, R., BENSOUSSAN, N., BALLY, M., CHEVALDONNÉ, P., CIGLIANO, M., DIAZ, D., HARMELIN, J. G., GAMBI, M. C., KERS-
TING, D. K., LEDOUX, J. B., LEJEUSNE, C., LINARES, C., MARSCHAL, C., PÉREZ, T., RIBES, M., ROMANO, J. C., SERRANO, E., TEIXIDO, N., TORRENTS, O., ZABALA, M., ZUBERER, F. & CERRANO, C. (2009). Mass mortality in Northwestern Mediterranean rocky benthic communities : effects of the 2003 heat wave. *Global Change Biology*, 15(5), 1090–1103.
- Gazeau, F., Parker, L. M., Comeau, S., Gattuso, J. P., O'Connor, W. A., Martin, S., Pértner, H. O. & Ross, P. M. (2013). Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Marine Biology*, 160(8), 2207–2245.
- Geffard, O., Geffard, A., His, E. & Budzinski, H. (2003). Assessment of the bio-availability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. *Marine Pollution Bulletin*, 46(4), 481–490.
- Geffard, O., His, E., Budzinski, H., Seaman, M. & Garrigues, P. (2001a). In situ monitoring of sea water quality with the embryo-larval bioassay of *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Serie III*, 324(12), 1149–1155.
- Geffard, O., His, E., Budzinski, H., Seaman, M. & Garrigues, P. (2001b). Qualité biologique de l'eau de mer évaluée in situ par le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 324(12), 1149–1155.

- Georgopoulos, P. G., Roy, A., Opiekun, R. E. & Liou, P. J. (2001). COPPER : ENVIRONMENTAL DYNAMICS AND HUMAN EXPOSURE ISSUES. *J Toxicol Environ Health*, 4(March), 341–394.
- Gerhardt, A. (2007). Aquatic Behavioral Ecotoxicology—Prospects and Limitations. *Human and Ecological Risk Assessment : An International Journal*, 13(3), 481–491.
- GESAMP (2001). A Sea of Troubles. (IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection) and Advisory Committee on Protection of the Sea. Technical report.
- Gielazyn, M. L., Ringwood, A. H., Piegorsch, W. W. & Stancyk, S. E. (2003). Detection of oxidative DNA damage in isolated marine bivalve hemocytes using the comet assay and formamidopyrimidine glycosylase (Fpg). *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 542(1-2), 15–22.
- Giese, A. C., Iverson, R. M. & Sanders, R. T. (1957). EFFECT OF NUTRITIONAL STATE AND OTHER CONDITIONS ON ULTRA-VIOLET RESISTANCE AND PHOTOREACTIVATION IN YEAST. 74, 271–279.
- Gieskes, J. M., Han, S., Rathburn, A., Rothwell, G., Pérez, M. E., Porrachia, M., Barbanti, A. & Deheyn, D. D. (2015). Anthropogenic contaminants in Venice Lagoon sediments and their pore fluids : Results from the SIOSED Project. *Marine Chemistry*, 174(August), 73–84.
- Giesy, J. P. & Graney, R. L. (1989). Recent developments in and intercomparisons of acute and chronic bioassays and bioindicators. *Hydrobiologia*, 188-189(1), 21–60.
- Gilbert, S. F. (2003). Developmental biology, Seventh edition (p. 784).
- Gill, S. S. & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930.
- Gomes, E. C., Stone, V. & Florida-James, G. (2011a). Impact of heat and pollution on oxidative stress and CC16 secretion after 8 km run. *European Journal of Applied Physiology*, 111(9), 2089–2097.
- Gomes, L. C., Di Benedetto, G. & Scorrano, L. (2011b). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature cell biology*, 13(5), 589–98.

- Gomes, T., Araújo, O., Pereira, R., Almeida, A. C., Cravo, A. & Bebianno, M. J. (2013). Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, *84*, 51–59.
- Gomes, T., Chora, S., Pereira, C. G., Cardoso, C. & Bebianno, M. J. (2014). Proteomic response of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to CuO NPs and Cu²⁺ : An exploratory biomarker discovery. *Aquatic Toxicology*, *155*, 327–336.
- Gomiero, A. & Viarengo, A. (2014). Effects of elevated temperature on the toxicity of copper and oxytetracycline in the marine model, *Euplotes crassus* : a climate change perspective. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, *194*, 262–71.
- González, H. & Brüggemann, L. (1991). Heavy Metals in Littoral Deposits Off Havana City, Cuba. *Chemistry and Ecology*, *5(3)*, 171–179.
- Gosling, E. e. (1992). The mussel *Mytilus* : ecology, physiology, genetics and culture.
- Gracey, A. Y., Chaney, M. L., Boomhower, J. P., Tyburczy, W. R., Connor, K. & Somero, G. N. (2008). Rhythms of Gene Expression in a Fluctuating Intertidal Environment. *Current Biology*, *18(19)*, 1501–1507.
- Gravato, C., Teles, M., Oliveira, M. & Santos, M. A. (2006). Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla* L. - the influence of pre-exposure to β -naphthoflavone. *Chemosphere*, *65(10)*, 1821–1830.
- Gray, A., Seed, R. & Richardson, C. (1997). Reproduction and growth of *Mytilus edulis chilensis* from the Falkland Islands. *Scientia Marina*, *61(2)*, 39–48.
- Greco, L., Pellerin, J., Capri, E., Garnerot, F., Louis, S., Fournier, M., Sacchi, A., Fusi, M., Lapointe, D. & Couture, P. (2011). Physiological effects of temperature and a herbicide mixture on the soft-shell clam *Mya arenaria* (Mollusca, Bivalvia). *Environmental toxicology and chemistry*, *30(1)*, 132–41.
- Guinotte, J. M. & Fabry, V. J. (2008). Ocean acidification and its potential effects on marine ecosystems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1134*, 320–42.
- Guisasola, M. (2008). Heat shock proteins (Hsps), biomarkers of toxicity of xenobiotic agents? *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A : Molecular*, *151(1)*, S42–S42.

- Gumpu, M. B., Sethuraman, S., Krishnan, U. M. & Rayappan, J. B. B. (2015). A review on detection of heavy metal ions in water - An electrochemical approach. *Sensors and Actuators, B : Chemical*, 213, 515–533.
- Habig, W., Pabst, M. & Jakoby, W. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem Biol Chem.*, 25(22), 249.
- Hallare, A., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H.-R. & Triebkorn, R. (2005). Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Thermal Biology*, 30(1), 7–17.
- Hamdoun, A. & Epel, D. (2007). Embryo stability and vulnerability in an always changing world. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(6), 1745–50.
- Handy, R. D. & Shaw, B. J. (2007). Ecotoxicity of nanomaterials to fish : Challenges for ecotoxicity testing. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3(3), 458–460.
- Hare, L., Carignan, R. & Huertadiaz, M. A. (1994). A field study of metal toxicity and accumulation by benthic invertebrates; Implications for the acid volatile sulfide (AVS) model. *Limnology and Oceanography*, 39(7), 1653–1668.
- Harley, C. D. G., Hughes, A. R., Hultgren, K. M., Miner, B. G., Sorte, C. J. B., Thornber, C. S., Rodriguez, L. F., Tomanek, L. & Williams, S. L. (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*, 9(2), 228–241.
- Harrison, R. G. (1990). Hybrid zones : windows on evolutionary process. Oxford. *Surv. Evol. Biol.*, 7, 69–128.
- Haynes, D. & Loong, D. (2002). Antifoulant (butyltin and copper) concentrations in sediments from the Great Barrier Reef World Heritage Area, Australia. *Environmental Pollution*, 120(2), 391–396.
- Heath, C. (1995). Escalation and De-escalation of Commitment in Response to Sunk Costs : The Role of Budgeting in Mental Accounting. *Organizational Behavior and Human Decision Processes*, 62(1), 38–54.
- Helmuth, B., Broitman, B. R., Blanchette, C. A., Gilman, S. E., Halpin, P., Harley, C. D. G., O'Donnell, M. J., Hofmann, G. E., Menge, B. & Strickland, D. (2006). Mosaic patterns of thermal stress in the rocky intertidal zone : Implications for climate change. *Ecological Monographs*, 76(4), 461–479.

- Helmuth, B., Harley, C. D. G., Halpin, P. M., O'Donnell, M., Hofmann, G. E. & Blanchette, C. a. (2002). Climate change and latitudinal patterns of intertidal thermal stress. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5595), 1015–1017.
- Hendriks, I. E. & Duarte, C. M. (2008). Allocation of effort and imbalances in biodiversity research. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 360(1), 15–20.
- Herbert, R., Southward, A., Shearer, M. & Hawkins, S. (2007). Influence of recruitment and temperature on distribution of intertidal barnacles in the English Channel. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87, 487–499.
- Hertel-Aas, T., Oughton, D. H., Jaworska, A. & Brunborg, G. (2011). Induction and repair of DNA strand breaks and oxidised bases in somatic and spermatogenic cells from the earthworm *Eisenia fetida* after exposure to ionising radiation. *Mutagenesis*, 26(6), 783–93.
- HICKLING, R., ROY, D. B., HILL, J. K., FOX, R. & THOMAS, C. D. (2006). The distributions of a wide range of taxonomic groups are expanding polewards. *Global Change Biology*, 12(3), 450–455.
- Hidalgo, E. & Domínguez, C. (1998). Study of cytotoxicity mechanisms of silver nitrate in human dermal fibroblasts. *Toxicology Letters*, 98(3), 169–179.
- Hilbish, T. J., Lima, F. P., Brannock, P. M., Fly, E. K., Rognstad, R. L. & Wetthey, D. S. (2012). Change and stasis in marine hybrid zones in response to climate warming. *Journal of Biogeography*, 39(4), 676–687.
- Hinrichsen, D. (1998). *Coastal Waters of the World : Trends, Threats, and Strategies*.
- His, E., Beiras, R. & Seaman, M. (1999a). The Assessment of Marine Pollution - Bioassays with Bivalve Embryos and Larvae. In *Advances in Marine Biology*, Volume 37 (pp. 1–178).
- His, E. & Cantin, C. (1995). Biologie et physiologie des coquillages.
- His, E., Heyvang, I., Geffard, O. & De Montaudouin, X. (1999b). A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Research*, 33(7), 1706–1718.
- His, E. & Robert, R. (1981). Le Danger des Traitements par le Sulfate de Cuivre en Zone Conchylicole : Toxicite vis-a-vis des Oeufs et des Jeunes Larves de

- Crassostrea gigas. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 45(2), 117–125.
- His, E., Robert, R. & Dinet, A. (1989). Marine Biology of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 100(July 1987), 455–463.
- His, E., Seaman, M. & Beiras, R. (1997). A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Research*, 31(2), 351–355.
- Hoare, K., Beaumont, A. & Davenport, J. (1995a). Variation among populations in the resistance of *Mytilus edulis* embryos to copper :adaptation to pollution? *Marine Ecology Progress Series*, 120(1981), 155–161.
- Hoare, K., Davenport, J. & Beaumont, A. R. (1995b). Effects of exposure and previous exposure to copper on growth of veliger larvae and survivorship of *Mytilus edulis* juveniles. *Marine Ecology Progress Series*, 120(1-3), 163–168.
- Hochachka, P. W. & Somero, G. N. (2002). *Biochemical Adaptation : Mechanism and Process in Physiological Evolution*.
- Hoegh-Guldberg, O. & Bruno, J. F. (2010). The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5985), 1523–8.
- Hoepffner, N. & Zibordi, G. (2009). Remote Sensing of Coastal Waters. In *Encyclopedia of Ocean Sciences* (pp. 732–741).
- Hoffmann, A. A. & Hercus, M. J. (2000). Environmental Stress as an Evolutionary Force. *BioScience*, 50(3), 217.
- Hofmann, G. E. (1999). Ecologically Relevant Variation in Induction and Function of Heat Shock Proteins in Marine Organisms. *American Zoologist*, 39(January), 889–900.
- Hofmann, G. E. & Todgham, A. E. (2010). Living in the Now : Physiological Mechanisms to Tolerate a Rapidly Changing Environment. *Annual Review of Physiology*, 72(1), 127–145.
- Hogstrand, C., Galvez, F. & Wood, C. M. (1996). Toxicity, silver accumulation and metallothionein induction in freshwater rainbow trout during exposure to different silver salts. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(7), 1102–1108.

- Hogstrand, C. & Wood, C. M. (1998). Toward a better understanding of the bioavailability, physiology, and toxicity of silver in fish : Implications for water quality criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(4), 547–561.
- Holligan, P. & de Boois, H. (1993). *Land-Ocean Interactions in the Coastal Zone (LOICZ) – science plan. IGBP global change report*. Number International Geosphere-Biosphere Programme, Stockholm, 25.
- Holmstrup, M., Bindesbøl, A. M., Oostingh, G. J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H. R., Loureiro, S., Soares, A. M. V. M., Ferreira, A. L. G., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P. E., Bayley, M., Svendsen, C. & Spurgeon, D. J. (2010). Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors : A review.
- Hossain, Z. & Huq, F. (2002). Studies on the interaction between Ag⁺ and DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91(2), 398–404.
- Houghton, J., Y, D., DJ, G., M, N., PJ, v. d. L., X, D., K, M. & C, J. (2001). Climate Change 2001 : The Scientific Basis. *Climate Change 2001 : The Scientific Basis* (p. 881).
- Howe, P. & Dobson, S. (2002). Silver and silver compounds : environmental aspects. Technical report.
- Hrs-Brenko, M., Claus, C. & Bubic, S. (1977). Synergistic effects of lead, salinity and temperature on embryonic development of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Biology*, 44, 109–115.
- Huey, R. B. & Bennett, A. F. (1987). Phylogenetic studies of coadaptation : preferred temperatures versus optimal performance temperature of lizards. *Evolution*, 41(5), 1098–1115.
- Hughes, T. P., Baird, A. H., Bellwood, D. R., Card, M., Connolly, S. R., Folke, C., Grosberg, R., Hoegh-Guldberg, O., Jackson, J. B. C., Kleypas, J., Lough, J. M., Marshall, P., Nyström, M., Palumbi, S. R., Pandolfi, J. M., Rosen, B. & Roughgarden, J. (2003). Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5635), 929–33.
- Hutton, M. & Symon, C. (1986). The quantities of cadmium, lead, mercury and arsenic entering the U.K. environment from human activities. *Science of the Total Environment*, The, 57(C), 129–150.
- Ifremer (2014). Qualité du Milieu Marin Littoral - Bulletin de la surveillance - Edition 2014. Technical report.

- Ippc (2007). *Climate Change 2007 : impacts, adaptation and vulnerability : contribution of Working Group II to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel*.
- IPCC (2014). *Summary for Policymakers*.
- Islam, M. S. & Tanaka, M. (2004). Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management : A review and synthesis.
- Jakimska, A., Konieczka, P., Skóra, K. & Namieśnik, J. (2011). Bioaccumulation of metals in tissues of marine animals, part II : Metal concentrations in animal tissues. *Polish Journal of Environmental Studies*, 20(5), 1127–1146.
- Jensen, R. H. & Davidson, N. (1966). Spectrophotometric, potentiometric, and density gradient ultracentrifugation studies of the binding of silver ion by DNA. *Biopolymers*, 4(1), 17–32.
- Jha, A. N. (2004). Genotoxicological studies in aquatic organisms : An overview.
- Jha, A. N., Cheung, V. V., Foulkes, M. E., Hill, S. J. & Depledge, M. H. (2000). Detection of genotoxins in the marine environment : Adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 464(2), 213–228.
- Jiang, C., Hu, H., Malewicz, B., Wang, Z. & Lü, J. (2004). Selenite-induced p53 Ser-15 phosphorylation and caspase-mediated apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 3(7), 877–84.
- Jiang, H. S., Li, M., Chang, F. Y., Li, W. & Yin, L. Y. (2012). Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO₃ toxicity to *Spirodela polyrhiza*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(8), 1880–1886.
- Jolly, C. (2000). Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(19), 1564–1572.
- Jones, C. (1984). Heat Shock : From bacteria to man : Edited by M J Schlesinger, M Ashburner and A Tissières. pp 440. Cold Spring Harbor Laboratory. 1982. ISBN 0–87969–158–1. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 12(1), 45.

- Jones, M. B. (1975). Synergistic effects of salinity, temperature and heavy metals on mortality and osmoregulation in marine and estuarine isopods (Crustacea). *Marine Biology*, 30(1), 13–20.
- Jorgensen, C., Larsen, P. & Riisgard, H. (1990). Effects of temperature on the mussel pump. *Marine Ecology Progress Series*, 64, 89–97.
- Kamel, N., Attig, H., Dagnino, A., Boussetta, H. & Banni, M. (2012). Increased temperatures affect oxidative stress markers and detoxification response to benzo[a]pyrene exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 63(4), 534–543.
- Kastan, M. B., Zhan, Q., El-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B. & Fornace, A. J. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 71(4), 587–597.
- Keeton, T. P., Burk, S. E. & Shull, G. E. (1993). Alternative splicing of exons encoding the calmodulin-binding domains and C termini of plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms 1,2, 3, and 4. *Journal of Biological Chemistry*, 268(4), 2740–2748.
- Kefaloyianni, E., Gourgou, E., Ferle, V., Kotsakis, E., Gaitanaki, C. & Beis, I. (2005). Acute thermal stress and various heavy metals induce tissue-specific pro- or anti-apoptotic events via the p38-MAPK signal transduction pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). *The Journal of experimental biology*, 208(Pt 23), 4427–36.
- Kennedy, V. S. & Mihursky, J. a. (1971). Upper Temperature Tolerances of Some Estuarine Bivalves. *Chesapeake Science*, 12(4), 193.
- Kennedy, V. S., Twilley, R. R., Kleypas, J. a., Cowan, J. H. & Hare, S. R. (2002). Coastal and marine ecosystems and global climate change : potential effects on U.S. resources. *Coastal and Marine Ecosystems and Global Climate Change* (p.64).
- Key, P. B. & Fulton, M. H. (2002). Characterization of cholinesterase activity in tissues of the grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72(3), 186–192.
- Khan, M. A. Q., Ahmed, S. A., Catalin, B., Khodadoust, A., Ajayi, O. & Vaughn, M. (2006). Effect of temperature on heavy metal toxicity to juvenile crayfish, *Orconectes immunis* (Hagen). *Environmental toxicology*, 21(5), 513–20.

- Khan, M. A. Q., Ahmed, S. A., Salazar, A., Gurumendi, J., Khan, A., Vargas, M. & von Catalin, B. (2007). Effect of temperature on heavy metal toxicity to earthworm *Lumbricus terrestris* (Annelida : Oligochaeta). *Environmental toxicology*, 22(5), 487–94.
- Kim, B. M., Rhee, J. S., Jeong, C. B., Seo, J. S., Park, G. S., Lee, Y. M. & Lee, J. S. (2014). Heavy metals induce oxidative stress and trigger oxidative stress-mediated heat shock protein (hsp) modulation in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C : Toxicology and Pharmacology*, 166, 65–74.
- Koolhaas, J. M., de Boer, S. F., Coppens, C. M. & Buwalda, B. (2010). Neuroendocrinology of coping styles : Towards understanding the biology of individual variation.
- Kramer, K. J. M., Jenner, H. A. & de Zwart, D. (1989). The valve movement response of mussels : a tool in biological monitoring.
- Kroeker, K. J., Kordas, R. L., Crim, R. N. & Singh, G. G. (2010). Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms. *Ecology letters*, 13(11), 1419–34.
- Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P. & Jha, A. N. (2009). Comet Assay measurements : A perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), 53–64.
- Kuranda, M. & Robbins, P. (1991). Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 19758–19767.
- Kusch, R. C., Krone, P. H. & Chivers, D. P. (2008). CHRONIC EXPOSURE TO LOW CONCENTRATIONS OF WATERBORNE CADMIUM DURING EMBRYONIC AND LARVAL DEVELOPMENT RESULTS IN THE LONG-TERM HINDRANCE OF ANTIPREDATOR BEHAVIOR IN ZEBRAFISH. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(3), 705.
- Kusk, K. O. & Wollenberger, L. (2007). Towards an internationally harmonized test method for reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in marine copepods. *Ecotoxicology*, 16(1), 183–195.
- Kuz'mina, V. V. & Ushakova, N. V. (2007). Effects of Temperature, pH, and Heavy Metals (Copper, Zinc) upon Proteinase Activities in Digestive Tract Mucosa. *Journal of Ichthyology*, 47(6), 473–480.

- Labrot, F., Ribera, D., Denis, M. S. & Narbonne, J. F. (1996). In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination : lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 1(1), 21–8.
- Lagadic, L., Caquet, T. & Ramade, F. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology*, 3(3), 193–208.
- Lam, I. K. S. & Wang, W.-X. (2006). Accumulation and elimination of aqueous and dietary silver in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 64(1), 26–35.
- Lam, P. K. S. & Gray, J. S. (2003). The use of biomarkers in environmental monitoring programmes.
- Lamarck, J. . B. D. (1819). Histoire naturelle des animaux sans vertèbres. *Belin, Paris*, 6, 343.
- Lapointe, D., Pierron, F. & Couture, P. (2011). Individual and combined effects of heat stress and aqueous or dietary copper exposure in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 104(1-2), 80–85.
- Lapworth, D., Baran, N., Stuart, M. & Ward, R. (2012). Emerging organic contaminants in groundwater : A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*, 163, 287–303.
- Le, T. T. Y., Vijver, M. G., Kinraide, T. B., Peijnenburg, W. J. G. M. & Hendriks, A. J. (2013). Modelling metal-metal interactions and metal toxicity to lettuce *Lactuca sativa* following mixture exposure ($\text{Cu}^2\text{-Zn}^2$ and $\text{Cu}^2\text{-Ag}$). *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 176, 185–92.
- Le Bihanic, F., Clérandeau, C., Le Menach, K., Morin, B., Budzinski, H., Cousin, X. & Cachot, J. (2014). Developmental toxicity of PAH mixtures in fish early life stages. Part II : adverse effects in Japanese medaka. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(24), 13732–13743.
- Le Gall, P. (1969). *Etude des moulières normandes : renouvellement, cycle, croissance. These, Université de Caen*.
- LeBlanc, N., Landry, T., Stryhn, H., Tremblay, R., McNiven, M. & Davidson, J. (2005). The effect of high air and water temperature on juvenile *Mytilus edulis* in Prince Edward Island, Canada. *Aquaculture*, 243(1-4), 185–194.

- Lee, D. Y., Fortin, C. & Campbell, P. G. C. (2005). Contrasting effects of chloride on the toxicity of silver to two green algae, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, *75*(2), 127–135.
- Legendre, P. & Legendre, L. (1998). Numerical Ecology. *Developments in Environmental Modelling*, *24*, 870.
- Lejeusne, C. & Chevaldonné, P. (2003). Regional warming - induced species shift in north - west Mediterranean marine caves. (*Ledoyer 1989*), 371–379.
- Lemaire, N., Pellerin, J., Fournier, M., Girault, L., Tamigneaux, E., Cartier, S. & Pelletier, E. (2006). Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel *mytilus* spp. from farm sites of eastern Quebec. *Aquaculture*, *261*(2), 729–751.
- Lesser, M. P. (2006). OXIDATIVE STRESS IN MARINE ENVIRONMENTS : Biochemistry and Physiological Ecology. *Annual Review of Physiology*, *68*(1), 253–278.
- Letelier, M. E., Lepe, A. M., Faúndez, M., Salazar, J., Marín, R., Aracena, P. & Speisky, H. (2005). Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, *151*(2), 71–82.
- Levin, L. A. (2006). Recent progress in understanding larval dispersal : New directions and digressions. *Integrative and Comparative Biology*, *46*(3), 282–297.
- Levitus, S., Antonov, J. & Boyer, T. (2005). Warming of the world ocean, 1955–2003. *Geophysical Research Letters*, *32*(2), 1–4.
- Lewis, C. & Galloway, T. (2009). Reproductive Consequences of Paternal Genotoxin Exposure in Marine Invertebrates. *Environmental Science Technology*, *43*(3), 928–933.
- Liau, S. Y., Read, D. C., Pugh, W. J., Furr, J. R. & Russell, a. D. (1997). Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups : relationship to the antibacterial action of silver ions. *Letters in applied microbiology*, *25*(1994), 279–283.
- Lima, F. P. & Wetthey, D. S. (2012). Three decades of high-resolution coastal sea surface temperatures reveal more than warming. *Nature Communications*, *3*, 704.
- Limbeck, S. (2003). The Role of Larval Thermal Tolerance in the Distribution of Blue Mussel Species within the Gulf of Maine. (*December*), 1–63.

- Linder, M. C. (2012). The relationship of copper to DNA damage and damage prevention in humans.
- Linnaeus, C. (1758). *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Editio decima, reformata. Laurentius Salvius : Holmiae. ii (p. 824).
- Lionello, P., Malanotte-Rizzoli, P., Boscolo, R., Alpert, P., Artale, V., Li, L., Luterbacher, J., May, W., Trigo, R., Tsimplis, M., Ulbrich, U. & Xoplaki, E. (2006). The Mediterranean climate : An overview of the main characteristics and issues. *Developments in Earth and Environmental Sciences*, 4(C), 1–26.
- Little, E. E., Archeski, R. D., Flerov, B. A. & Kozlovskaya, V. I. (1990). Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19(3), 380–385.
- Little, E. E. & Finger, S. E. (1990). Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(1), 13–19.
- Liu, Y., Vijver, M. G. & Peijnenburg, W. J. G. M. (2014). Comparing three approaches in extending biotic ligand models to predict the toxicity of binary metal mixtures (Cu-Ni, Cu-Zn and Cu-Ag) to lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Chemosphere*, 112, 282–8.
- Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms.
- Lloyd, D. R. & Phillips, D. H. (1999). Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) Fenton reactions : Evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1-2), 23–36.
- Loarie, S. R., Duffy, P. B., Hamilton, H., Asner, G. P., Field, C. B. & Ackerly, D. D. (2009). The velocity of climate change. *Nature*, 462(7276), 1052–1055.
- Lockwood, B. L., Sanders, J. G. & Somero, G. N. (2010). Transcriptomic responses to heat stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*) : molecular correlates of invasive success. *The Journal of experimental biology*, 213(Pt 20), 3548–58.
- LOICZ (2005). *Coastal Fluxes in the Anthropocene*. Number MARCH.

- Longo, F. J. & Anderson, E. (1970). A CYTOLOGICAL STUDY OF THE RELATION OF THE CORTICAL REACTION TO SUBSEQUENT EVENTS OF FERTILIZATION IN URETHANE-TREATED EGGS OF THE SEA URCHIN, *ARBACIA PUNCTULATA*. *The Journal of cell Biology*, *47*(1956), 646–665.
- Lotze, H. K., Lenihan, H. S., Bourque, B. J., Bradbury, R. H., Cooke, R. G., Kay, M. C., Kidwell, S. M., Kirby, M. X., Peterson, C. H. & Jackson, J. B. C. (2006). Depletion, degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. *Science (New York, N.Y.)*, *312*(5781), 1806–9.
- Lowe, C. N. & Butt, K. R. (2007). Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies : A critical review. *European Journal of Soil Biology*, *43*(SUPPL. 1), S281–S288.
- LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR, A. & RANDALL, R. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Readings*, *193*(1), 265–275.
- Lubet, P. (1973). *Exposé synoptique des données biologiques sur la moule Mytilus galloprovincialis (Lamarck 1819)*, Volume 88.
- Lucas, C. H. & Horton, A. A. (2014). Short-term effects of the heavy metals, Silver and copper, on polyps of the common jellyfish, *Aurelia aurita*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *461*, 154–161.
- Luoma, S. N. (1983). Bioavailability of trace metals to aquatic organisms - A review.
- Luoma, S. N. (2008). Silver nanotechnologies and the environment : Old problems or new challenges? *Project on Emerging Nanotechnologies, Woodrow Wilson Centre, Washington, DC, USA, (September)*, 72.
- Luoma, S. N., Ho, Y. B. & Bryan, G. W. (1995). Fate, bioavailability and toxicity of silver in estuarine environment. *Marine Pollution Bulletin*, *31*(95), 44–54.
- Lüthi, D., Le Floch, M., Bereiter, B., Blunier, T., Barnola, J.-M., Siegenthaler, U., Raynaud, D., Jouzel, J., Fischer, H., Kawamura, K. & Stocker, T. F. (2008). High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000–800,000 years before present. *Nature*, *453*(7193), 379–382.
- MacColl, A. D. C. (2011). The ecological causes of evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, *26*(10), 514–522.

- Mackay, K., Byers, P. H. & Dalgleish, R. (1993). An RT-PCR-SSCP screening strategy for detection of mutations in the gene encoding the alpha 1 chain of type I collagen : application to four patients with osteogenesis imperfecta. *Human molecular genetics*, 2(8), 1155–1160.
- Maggini, R., Lehmann, A., Kéry, M., Schmid, H., Beniston, M., Jenni, L. & Zbinden, N. (2011). Are Swiss birds tracking climate change?. Detecting elevational shifts using response curve shapes. *Ecological Modelling*, 222(1), 21–32.
- Mahmood, K., Jadoon, S., Mahmood, Q., Irshad, M. & Hussain, J. (2014). Synergistic effects of toxic elements on heat shock proteins. *BioMed Research International*, 2014.
- Mai, H., Cachot, J., Brune, J., Geffard, O., Belles, A., Budzinski, H. & Morin, B. (2012). Embryotoxic and genotoxic effects of heavy metals and pesticides on early life stages of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Marine pollution bulletin*, 64(12), 2663–70.
- Mai, H., Gonzalez, P., Pardon, P., Tapie, N., Budzinski, H., Cachot, J. & Morin, B. (2014). Comparative responses of sperm cells and embryos of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to exposure to metolachlor and its degradation products. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 147, 48–56.
- MALCOLM, J. R., LIU, C., NEILSON, R. P., HANSEN, L. & HANNAH, L. (2006). Global Warming and Extinctions of Endemic Species from Biodiversity Hotspots. *Conservation Biology*, 20(2), 538–548.
- Mallet, A., Carver, C. & Freeman, K. (1990). Summer mortality of the blue mussel in eastern Canada : spatial, temporal, stock and age variation . *Marine Ecology Progress Series*, 67(1987), 35–41.
- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome.
- Mamindy-Pajany, Y., Libralato, G., Roméo, M., Hurel, C., Losso, C., Ghirardini, A. V. & Marmier, N. (2010). Ecotoxicological evaluation of Mediterranean dredged sediment ports based on elutriates with oyster embryotoxicity tests after composting process. *Water Research*, 44(6), 1986–1994.
- Mance, G. (1987). *Pollution threat of heavy metals in aquatic environments*.
- Maniez, C. & Laug, M. (2009). Captage du CO2 dans l'atmosphère. *Ecole des Mines Douai*, (0), 1–50.

- Mann, R. & Wolf, C. C. (1983). Swimming behaviour of larvae of the ocean quahog *Arctica islandica* in response to pressure and temperature *. *Marine Ecology Progress Series*, 13, 211–218.
- Manzl, C., Enrich, J., Ebner, H., Dallinger, R. & Krumschnabel, G. (2004). Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. *Toxicology*, 196(1-2), 57–64.
- Margoshes, M. & Vallee, B. L. (1957). A CADMIUM PROTEIN FROM EQUINE KIDNEY CORTEX. *Journal of the American Chemical Society*, 79(17), 4813–4814.
- Marigómez, I., Zorita, I., Izagirre, U., Ortiz-Zarragoitia, M., Navarro, P., Etxebarria, N., Orbea, A., Soto, M. & Cajaraville, M. P. (2013). Combined use of native and caged mussels to assess biological effects of pollution through the integrative biomarker approach. *Aquatic Toxicology*, 136-137(April 2013), 32–48.
- Marshall, D. J. (2006). Reliably estimating the effect of toxicants on fertilization success in marine broadcast spawners. *Marine Pollution Bulletin*, 52(7), 734–738.
- Martin, M., Osborn, K. E., Billig, P. & Glickstein, N. (1981). Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Marine Pollution Bulletin*, 12(9), 305–308.
- Martínez, M. L., Intralawan, A., Vázquez, G., Pérez-Maqueo, O., Sutton, P. & Landgrave, R. (2007). The coasts of our world : Ecological, economic and social importance. *Ecological Economics*, 63(2-3), 254–272.
- Mason, A. & Jenkins, K. (1995). *Metal detoxification in aquatic organisms*. In : Tessier A, Turner DR, editors. *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Ecosystems*. New York, NY : Wiley,;
- Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S.-i. & Tsuchido, T. (2003). Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4278–4281.
- Matthiessen, P. & Law, R. J. (2002). Contaminants and their effects on estuarine and coastal organisms in the United Kingdom in the late twentieth century. *Environmental Pollution*, 120(3), 739–757.
- McCord, J. & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 244(22)(November 25), 6049–6055.

- McDonald, P., Henderson, A. R. & Heron, S. J. E. (1991). *The biochemistry of silage*. Chalcombe Publications, London.
- McDonnell, G. & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants : activity, action, and resistance. *Clinical microbiology reviews*, 12(1), 147–79.
- McNeil, P. L., Boyle, D., Henry, T. B., Handy, R. D. & Sloman, K. A. (2014). Effects of metal nanoparticles on the lateral line system and behaviour in early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 152, 318–323.
- Meng, L., Orphanides, C. D. & Christopher Powell, J. (2002). Use of a Fish Index to Assess Habitat Quality in Narragansett Bay, Rhode Island. *Transactions of the American Fisheries Society*, 131(4), 731–742.
- Meng, X., Li, C., Bao, H., Fang, J., Liu, Z. & Zhang, Y. (2015). Validating the importance of two acetylcholinesterases in insecticide sensitivities by RNAi in *Pardosa pseudoannulata*, an important predatory enemy against several insect pests. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 125, 26–30.
- Merzendorfer, H. & Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects : structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, 206(24), 4393–4412.
- Mestre, N. C., Thatje, S. & Tyler, P. A. (2009). The ocean is not deep enough : pressure tolerances during early ontogeny of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences*, 276(1657), 717–726.
- Micheli, F. & Halpern, B. S. (2005). Low functional redundancy in coastal marine assemblages. *Ecology Letters*, 8(4), 391–400.
- Milam, C. D., Farris, J. L., Dwyer, F. J. & Hardesty, D. K. (2005). Acute toxicity of six freshwater mussel species (*Glochidia*) to six chemicals : Implications for daphnids and *Utterbackia imbecillis* as surrogates for protection of freshwater mussels (*Unionidae*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(2), 166–173.
- Mileikovsky, S. A. (1973). Speed of active movement of pelagic larvae of marine bottom invertebrates and their ability to regulate their vertical position. *Marine Biology*, 23(1), 11–17.
- Miller, A., Densmore, C., Degens, E., Hathaway, J., Manheim, F., McFarlin, P., Pocklington, R. & Jokela, A. (1966). Hot brines and recent iron deposits in deeps of the Red Sea. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 30(3), 341–359.

- Minghetti, M., Leaver, M. J. & George, S. G. (2010). Multiple Cu-ATPase genes are differentially expressed and transcriptionally regulated by Cu exposure in sea bream, *Sparus aurata*. *Aquatic Toxicology*, *97*(1), 23–33.
- Mohamed, M. A., M.E. Mahdy, E. S., Ghazy, A. E. H. M., Ibrahim, N. M., El-Mezayen, H. A. & Ghanem, M. M. E. (2015). Acetylcholinesterases from entomopathogenic nematode *Heterorhabditid* bacteriophora : Susceptibility to insecticides and immunological characteristics.
- Mohanty, S., Town, T., Yagi, T., Scheidig, C., Kwan, K. Y., Allore, H. G., Flavell, R. A. & Shaw, A. C. (2008). Defective p53 engagement after the induction of DNA damage in cells deficient in topoisomerase 3beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(13), 5063–8.
- Moksnes, P.-o., Corell, H., Tryman, K., Hordoir, R. & Jonsson, P. R. (2014). Larval behavior and dispersal mechanisms in shore crab larvae (*Carcinus maenas*) : Local adaptations to different tidal environments ? *Limnology and Oceanography*, *59*(2), 588–602.
- Monserrat, J. M., Martínez, P. E., Geracitano, L. A., Lund Amado, L., Martinez Gaspar Martins, C., Lopes Leães Pinho, G., Soares Chaves, I., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J. & Bianchini, A. (2007). Pollution biomarkers in estuarine animals : Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *146*(1-2 SPEC. ISS.), 221–234.
- Montecucco, A., Biamonti, G., Savini, E., Focher, F., Spadari, S. & Ciarrocchi, G. (1992). DNA ligase I gene expression during differentiation and cell proliferation. *Nucleic Acids Research*, *20*(23), 6209–6214.
- Moore, P. & Rainbow, P. (1987). Copper and zinc in an ecological series of talitroidean Amphipoda (Crustacea). *Oecologia*, *73*, 120–126.
- Morgan, T. P., Grosell, M., Gilmour, K. M., Playle, R. C. & Wood, C. M. (2004). Time course analysis of the mechanism by which silver inhibits active Na⁺ and Cl⁻ uptake in gills of rainbow trout. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, *287*(1), R234–R242.
- Morimoto, R. I. (1998). Regulation of the heat-shock transcriptional response : cross talk between a family of heat-shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev*, *12*, 3788–3796.
- Morris, S. & Oliver, S. (1999). Circulatory, respiratory and metabolic response to emersion and low temperature of *Jasus edwardsii* : Simulation studies of commercial shipping methods. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, *122*(3), 299–308.

- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpentine, A., Lebel, J. M., Jha, A. N. & Costil, K. (2013). Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*, 128–129, 67–78.
- Murawski, S. A. (1993). Climate Change and Marine Fish Distributions : Forecasting from Historical Analogy. *Transactions of the American Fisheries Society*, 122(5), 647–658.
- Murgarella, M., Puiu, D., Novoa, B., Figueras, A., Posada, D. & Canchaya, C. (2016). A First Insight into the Genome of the Filter-Feeder Mussel *Mytilus galloprovincialis*. *PloS one*, 11(3), e0151561.
- Muttray, A. F., Cox, R. L., St-Jean, S., Van Poppelen, P., Reinisch, C. L. & Baldwin, S. A. (2005). Identification and phylogenetic comparison of p53 in two distinct mussel species (*Mytilus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 140(2), 237–250.
- Naciri, M. (1998). Dynamique d ' une population de moules , *Mytilus galloprovincialis* (Lmk .), vivant sur la côte atlantique marocaine. *Bulletin de l'Institut Scientifique*, 21(1963), 43–50.
- Nadella, S. R., Fitzpatrick, J. L., Franklin, N., Bucking, C., Smith, S. & Wood, C. M. (2009). Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossolus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology Pharmacology*, 149(3), 340–348.
- Najimi, S., Bouhaimi, A., Daubéze, M., Zekhnini, A., Pellerin, J., Narbonne, J. F. & Moukrim, A. (1997). Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(6), 901–908.
- Negri, A., Oliveri, C., Sforzini, S., Mignione, F., Viarengo, A. & Banni, M. (2013). Transcriptional response of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) following exposure to heat stress and copper. *PloS one*, 8(6), e66802.
- Nendza, M. (2002). Inventory of marine biotest methods for the evaluation of dredged material and sediments. *Chemosphere*, 48(8), 865–883.
- Ng, T. Y. T., Rainbow, P. S., Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C. & Wang, W. X. (2007). Metallothionein turnover, cytosolic distribution and the uptake of Cd by the green mussel *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology*, 84(2 SPEC. ISS.), 153–161.

- Nicholls, R. J. & Hoozemans, F. M. J. (1996). The Mediterranean : Vulnerability to coastal implications of climate change. *Ocean and Coastal Management*, 31(2-3), 105–132.
- Nieboer, E. & Richardson, D. H. S. (1980). The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution. Series B, Chemical and Physical*, 1(1), 3–26.
- Nobre, A. M. (2011). Scientific approaches to address challenges in coastal management. *Marine Ecology Progress Series*, 434(1), 279–289.
- Nölte, J. (1988). Pollution source analysis of river water and sewage sludge. *Environmental Technology Letters*, 9(8), 857–868.
- North, E. W., Schlag, Z., Hood, R. R., Li, M., Zhong, L., Gross, T. & Kennedy, V. S. (2008). Vertical swimming behavior influences the dispersal of simulated oyster larvae in a coupled particle-tracking and hydrodynamic model of Chesapeake Bay. *Marine Ecology Progress Series*, 359(November 2014), 99–115.
- Noyes, P. D., McElwee, M. K., Miller, H. D., Clark, B. W., Van Tiem, L. A., Walcott, K. C., Erwin, K. N. & Levin, E. D. (2009). The toxicology of climate change : Environmental contaminants in a warming world. *Environment International*, 35(6), 971–986.
- NRC, N. R. C. (2000). A Review of the draft report of the NCI-CDC Working Group to Revise the “1985 Radioepidemiological Tables”.
- Nriagu, J. O. (1979). Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere.
- Okoro, H. K., Fatoki, O. S., Adekola, F. A., Ximba, B. J., Snyman, R. G. & Opeolu, B. (2011). Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 213. *Toxicology*, 213(I), 27–54.
- Olive, P. L. & Banáth, J. P. (1995). Sizing Highly Fragmented DNA in Individual Apoptotic Cells Using the Comet Assay and a DNA Crosslinking Agent. *Experimental Cell Research*, 221(1), 19–26.
- Olson, D. L. & Christensen, G. M. (1980). Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (in vitro). *Environmental Research*, 21(2), 327–335.

- Osterauer, R. & Köhler, H. R. (2008). Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, *86*(4), 485–494.
- Ostling, O. & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *123*(1), 291–298.
- Panula, P., Sallinen, V., Sundvik, M., Kolehmainen, J., Torkko, V., Tiittula, A., Moshnyakov, M. & Podlasz, P. (2006). Modulatory neurotransmitter systems and behavior : towards zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Zebrafish*, *3*(2), 235–47.
- Parmesan, C. & Yohe, G. (2003). A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, *421*(6918), 37–42.
- Pat, W., Stone, G. & Johnston, I. a. (2000). *Environmental physiology of animals*.
- Pavidi, J., Smodi, B., Skreblin, M., Kregart, I. & Ljubljana, S. (1994). sensitivity toward zn and cd and their.
- Peakall, D. (1992). Animal Biomarkers as Pollution Indicators.
- Pechenik, J. A. (1999). On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrate life cycles. *Marine Ecology Progress Series*, *177*, 269–297.
- Pechenik, J. A. (2006). Larval experience and latent effects - Metamorphosis is not a new beginning. *Integrative and Comparative Biology*, *46*(3), 323–333.
- Pechenik, J. A. & Tyrell, A. S. (2015). Larval diet alters larval growth rates and post-metamorphic performance in the marine gastropod *Crepidula fornicata*. *Marine Biology*, *162*(8), 1597–1610.
- Pepou, G. & Giovannini, M. G. (2004). Changes in Acetylcholine Extracellular Levels During Cognitive Processes. (*Gaddum 1961*), 21–27.
- Pernetta, J. & Milliman, J. (1995). *Land Ocean Interactions in the coastal zone*. Number IGBP Report, Stockholm 33, 215p.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, *30*(9), 36e–36.

- Pfeifer, S., Schiedek, D. & Dippner, J. W. (2005). Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 320(1), 93–103.
- Philchenkov, A. (2004). Caspases : potential targets for regulating cell death. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8(4), 432–444.
- Philips, D. J. H. & Rainbow, P. S. (1994). Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants Environmental Management Series Elsevier Applied Science, London,. *Journal of Applied Toxicology*, 14(4), 315–316.
- Piano, A., Asirelli, C., Caselli, F. & Fabbri, E. (2002). Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell stress chaperones*, 7(3), 250–257.
- Pinto, G. & Ferranti, P. (2016). *Impact of Climate Change on the Food Chain*. Elsevier.
- PNUE / PAM / Plan Bleu (2009). *Etat De L ' Environnement Et Du Developpement En Mediterranee - 2009*.
- Poirier, L., Quiniou, F., Ruiz, N., Montagu, M., Amiard, J. C. & Pouchus, Y. F. (2007). Toxicity assessment of peptaibols and contaminated sediments on *Crasostrea gigas* embryos. *Aquatic Toxicology*, 83(4), 254–262.
- Poloczanska, E. S., Brown, C. J., Sydeman, W. J., Kiessling, W., Schoeman, D. S., Moore, P. J., Brander, K., Bruno, J. F., Buckley, L. B., Burrows, M. T., Duarte, C. M., Halpern, B. S., Holding, J., Kappel, C. V., O'Connor, M. I., Pandolfi, J. M., Parmesan, C., Schwing, F., Thompson, S. A. & Richardson, A. J. (2013). Global imprint of climate change on marine life. *Nature Clim. Change*, 3(10), 919–925.
- Pörtner, H. O. (2008). Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming : A physiologist's view. *Marine Ecology Progress Series*, 373, 203–217.
- Pörtner, H.-O., Karl, D. M., Boyd, P. W., Cheung, W., Lluch-Cota, S. E., Nojiri, Y., Schmidt, D. N., Zavialov, P. O., Alheit, J., Aristegui, J., Armstrong, C., Beaugrand, G., Belkovich, V., Bowler, C., Brewer, P., Church, M., Cooley, S. R., del Monte-Luna, P., Edwards, M., Flint, M., Follows, M. J., Frölicher, T., Fulton, E. A., Gattuso, J.-P., Hoegh-Guldberg, O., Hofmann, E. E., Knoll, A. H., Levin, L. A., Menzel, L., Moloney, C. L., Perry, R. I., Poloczanska, E. S., Roberts, J. M., Rost, B., Sarmiento, J. L., Sedlacek, J., Storch, D., Wiencke, C. & Wittmann, A. C. (2014). Ocean Systems.

- Pörtner, H. O. & Knust, R. (2007). Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, *315*(5808), 95–97.
- Pörtner, H. O., Peck, L., Somero, G. & B, P. T. R. S. (2007). Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms : an integrative view Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms : an integrative view. *Society*, (July 2009), 2233–2258.
- Prasada Rao, D. & Khan, M. (2000). Zebra mussels : Enhancement of copper toxicity by high temperature and its relationship with respiration and metabolism. *Water Environment Research*, *72*(2), 175–178.
- Prato, E. & Biandolino, F. (2010). COMBINED TOXICITY OF MERCURY, COPPER AND CADMIUM ON EMBRYOGENESIS AND EARLY LARVAL STAGES OF THE MYTILUS GALLOPROVINCIALIS. *Environmental technology*, *28*(8), 915–20.
- Praveen Kumar, M. K., Shyama, S. K., Sonaye, B. S., Naik, U. R., Kadam, S. B., Bipin, P. D., D'costa, A. & Chaubey, R. C. (2014). Evaluation of diation-induced DNA damage in two species of bivalves and their relative sensitivity using comet assay. *Aquatic Toxicology*, *150*, 1–8.
- 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*(4), 497–507.
- PRZESLAWSKI, R., AHYONG, S., BYRNE, M., WÖRHEIDE, G. & HUTCHINGS, P. (2008). Beyond corals and fish : the effects of climate change on noncoral benthic invertebrates of tropical reefs. *Global Change Biology*, *14*(12), 2773–2795.
- Przeslawski, R., Alvarez, B., Kool, J., Bridge, T., Caley, M. J. & Nichol, S. (2015). Implications of sponge biodiversity patterns for the management of a marine reserve in northern Australia. *PLoS ONE*, *10*(11), 1–20.
- Pytharopoulou, S., Grintzalis, K., Sazakli, E., Leotsinidis, M., Georgiou, C. D. & Kalpaxis, D. L. (2011a). Translational responses and oxidative stress of mussels experimentally exposed to Hg, Cu and Cd : One pattern does not fit at all. *Aquatic toxicology*.
- Pytharopoulou, S., Grintzalis, K., Sazakli, E., Leotsinidis, M., Georgiou, C. D. & Kalpaxis, D. L. (2011b). Translational responses and oxidative stress of mussels experimentally exposed to Hg, Cu and Cd : One pattern does not fit at all. *Aquatic Toxicology*, *105*(1), 157–165.

- Quiniou, F., Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Geffard, A., Mouneyrac, C., Budzinski, H. & Roméo, M. (2007). Marine water quality assessment using transplanted oyster larvae. *Environment International*, *33*(1), 27–33.
- Quiniou, F., His, E., Delesmont, R., Caisey, X., Grouhel, A. & Thébaud, M.-J. (2005). Bio-indicateur de la toxicité potentielle de milieux aqueux : bio-essai « Développement embryon-larvaire de bivalve ».
- Rai, M., Yadav, A. & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials.
- Rainbow, P. S. & Smith, B. D. (2010). Trophic transfer of trace metals : Subcellular compartmentalisation in bivalve prey and comparative assimilation efficiencies of two invertebrate predators. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *390*(2), 143–148.
- Rajagopal, S., Van Der Velde, G., Jansen, J., Van Der Gaag, M., Atsma, G., Janssen-Mommen, J. P. M., Polman, H. & Jenner, H. A. (2005). Thermal tolerance of the invasive oyster *Crassostrea gigas* : Feasibility of heat treatment as an antifouling option. *Water Research*, *39*(18), 4335–4342.
- Rajeshkumar, S. & Munuswamy, N. (2011). Impact of metals on histopathology and expression of HSP 70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattuppalli Island, South East Coast, India. *Chemosphere*, *83*(4), 415–421.
- Ramagopal, S. (1987). Differential mRNA transcription during salinity stress in barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(1), 94–98.
- Rao, a. V. S. K. & Shaha, C. (2000). Role of glutathione S-transferases in oxidative stress-induced male germ cell apoptosis. *Free Radical Biology Medicine*, *29*(10), 1015–1027.
- Ratkaj, I., Žurga, P., Bulog, A., Peter-Katalinić, J. & Pavelić, S. K. (2015). 70-kDa heat shock cognate protein expression as a putative biomarker of heavy-metal burden in *Mytilus galloprovincialis*. *SpringerPlus*, *4*(1), 344.
- Ratte, H. T. (1999). Bioaccumulation and toxicity of silver compounds : A review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *18*(1), 89–108.
- Ray, G. & Grassle, J. (1991). Marine Biological Diversity.
- Recommendation 2002/413/EC (2002). Recommendation 2002/413/EC of the European Parliament and of the Council of 30 May 2002 concerning the implementation of Integrated Coastal Zone Management in Europe. Technical report.

- Regoli, F. & Giuliani, M. E. (2014). Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine Environmental Research*, 93(November), 106–117.
- Regoli, F., Giuliani, M. E., Benedetti, M. & Arukwe, A. (2011). Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring : A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquatic Toxicology*, 105(3-4 SUPPL.), 56–66.
- Regoli, F., Nigro, M., Bompadre, S. & Winston, G. W. (2000). Total oxidant scavenging capacity (TOSC) of microsomal and cytosolic fractions from Antarctic, Arctic and Mediterranean scallops : Differentiation between three potent oxidants. *Aquatic Toxicology*, 49(1-2), 13–25.
- Regoli, F., Nigro, M., Chiantore, M. & Winston, G. W. (2002). Seasonal variations of susceptibility to oxidative stress in *Adamussium colbecki*, a key bioindicator species for the Antarctic marine environment. *Science of the Total Environment*, 289(1-3), 205–211.
- Reichelt-Brushett, A. & Harrison, P. (2005). The effect of selected trace metals on the fertilization success of several scleractinian coral species.
- Renaudeau, D., Collin, A., Yahav, S., de Basilio, V., Gourdine, J. L. & Collier, R. J. (2012). Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal*, 6(5), 707–728.
- Ridgwell, A. & Schmidt, D. N. (2010). Past constraints on the vulnerability of marine calcifiers to massive carbon dioxide release. *Nature Geoscience*, 3(3), 196–200.
- Riebesell, U. & Gattuso, J.-P. (2014). Lessons learned from ocean acidification research. *Nature Climate Change*, 5(1), 12–14.
- Riginos, C. & Cunningham, C. W. (2005). Local adaptation and species segregation in two mussel (*Mytilus edulis* x *Mytilus trossulus*) hybrid zones. *Molecular ecology*, 14(2), 381–400.
- Ringwood, A. (1991). Short term accumulation of cadmium by embryos larvae and adults of an hawaiian bivalve *isognomon californicum*. *Journal Of Experimental* (pp. 55–66).
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *drosophila*. *Experientia*, 18(12), 571–573.

- Ritter, L., Solomon, K. R., Sibley, P. K., Solomon, K., Sibley, P., Hall, K., Keen, P., Mattu, G. & Linton, B. (2002). Sources , Pathways , and Relative Risks of Contaminants in Surface Water and Groundwater : A Perspective Prepared for ... OF CONTAMINANTS IN SURFACE WATER AND GROUNDWATER : A PERSPECTIVE PREPARED FOR THE WALKERTON INQUIRY. *Journal of Toxicology and Environment Health, Part A*, 65(January), 1–142.
- Rittschof, D. & McClellan-Green, P. (2005). Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology.
- RNO (2006). RNO- Surveillance du Milieu Marin. Travaux du RNO. Edition 2006. *fremer et Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable*.
- Rocher, B., Le Goff, J., Peluhet, L., Briand, M., Manduzio, H., Gallois, J., Devier, M. H., Geffard, O., Gricourt, L., Augagneur, S., Budzinski, H., Pottier, D., André, V., Lebailly, P. & Cachot, J. (2006). Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquatic Toxicology*, 79(1), 65–77.
- Roesijadi, G., Bogumil, R., Vašák, M. & Kägi, J. H. R. (1998). Modulation of DNA binding of a Tramtrack zinc finger peptide by the metallothionein-thionein conjugate pair. *Journal of Biological Chemistry*, 273(28), 17425–17432.
- Root, T., Price, J., Hall, K. & Schneider, S. (2003). Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 421(6918), 57–60.
- Rosenberg, R. & Costlow, J. D. (1976). Synergistic effects of cadmium and salinity combined with constant and cycling temperatures on the larval development of two estuarine crab species. *Mar.Biol.*, 38, 291–304.
- Rotchell, J. M. & Ciocan, C. M. (2007). Response to Comment on “Conservation of Cancer Genes in the Marine Invertebrate *Mytilus edulis* ”. *Environmental Science Technology*, 41(13), 4832–4832.
- Röth, E., Marczin, N., Balatonyi, B., Ghosh, S., Kovács, V., Alotti, N., Borsiczky, B. & Gasz, B. (2011). Effect of a glutathione S-transferase inhibitor on oxidative stress and ischemia-reperfusion-induced apoptotic signalling of cultured cardiomyocytes. *Experimental and Clinical Cardiology*, 16(3), 92–96.
- Roussel, E. G., Bonavita, M.-A. C., Querellou, J., Cragg, B. A., Webster, G., Prieur, D. & Parkes, R. J. (2008). Extending the Sub-Sea-Floor Biosphere. *Science*, 320(5879), 1046–1046.

- Rudragouda, S., Shambanagouda, M., Marigoudar, R., Nazeer, R., Raichur, A., Ahmed, N. & David, M. (2009). Cypermethrin induced respiratory and behavioural responses of the Cypermethrin induced respiratory and behavioural responses of the freshwater teleost, freshwater teleost, *Labeo rohita* *Labeo rohita* (Hamilton) (Hamilton). *Veterinarski Arhiv*, 79(6), 583–590.
- Sadhu, C. & Gedamu, L. (1988). Regulation of Human Metallothionein (MT) Genes. *J Biol Chem.*, 263(6), 2679–2684.
- Sagripanti, J. L., Goering, P. L. & Lamanna, A. (1991). Interaction of copper with DNA and antagonism by other metals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 110(3), 477–485.
- Sandahl, J. F., Baldwin, D. H., Jenkins, J. J. & Scholz, N. L. (2005). COMPARATIVE THRESHOLDS FOR ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITION AND BEHAVIORAL IMPAIRMENT IN COHO SALMON EXPOSED TO CHLORPYRIFOS. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(1), 136.
- Savery, L. C., Wise, S. S., Falank, C., Wise, J., Jr, C. G., Perkins, W. D. T. C., Mason, M. D., Payne, R., Kerr, I. & Sr1, J. P. W. (2013). Global Assessment of Silver Pollution using Sperm Whales (*Physeter macrocephalus*) as an Indicator Species. *Journal of Environmental Analytical Toxicology*, 03(02).
- Saxena, J., Meloni, D., Huang, M. T., Heck, D. E., Laskin, J. D., Heindel, N. D. & Young, S. C. (2015). Ethynylphenyl carbonates and carbamates as dual-action acetylcholinesterase inhibitors and anti-inflammatory agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 25(23), 5609–5612.
- Scheil, V. & Köhler, H. R. (2009). Influence of nickel chloride, chlorpyrifos, and imidacloprid in combination with different temperatures on the embryogenesis of the Zebrafish *Danio rerio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56(2), 238–243.
- Schulte, P. M. (2007). Responses to environmental stressors in an estuarine fish : Interacting stressors and the impacts of local adaptation. *Journal of Thermal Biology*, 32(3), 152–161.
- Seed, R. (1969). The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamellibranchiata) on exposed rocky shores - I. Breeding and settlement. *Oecologia*, 3(3-4), 277–316.
- Seed, R. (1992). Systematics evolution and distribution of mussels belonging to the genus *Mytilus* : An overview. *Amer. Muluc. Bull*, 9, 123–127.

- Serafim, A., Lopes, B., Company, R., Cravo, A., Gomes, T., Sousa, V. & Bebianno, M. J. (2011). A multi-biomarker approach in cross-transplanted mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology*, *20*(8), 1959–1974.
- Sheffrin, N., Fieller, N. & Williams, E. (1984). behavioural bioassay for impaired sea-water quality using the plantigrades of the common mussel *Mytilus edulis* L. : the response to copper. *Aquatic toxicology*.
- Shin, P. K. S., Ng, A. W. M. & Cheung, R. Y. H. (2002). Burrowing responses of the short-neck clam *Ruditapes philippinarum* to sediment contaminants. In *Marine Pollution Bulletin*, Volume 45 (pp. 133–139).
- SIBLY, R. M. & CALOW, P. (1989). A life-cycle theory of responses to stress. *Biological Journal of the Linnean Society*, *37*(1-2), 101–116.
- Sinervo, B., Méndez-de-la Cruz, F., Miles, D. B., Heulin, B., Bastiaans, E., Villagrán-Santa Cruz, M., Lara-Resendiz, R., Martínez-Méndez, N., Calderón-Espinosa, M. L., Meza-Lázaro, R. N., Gadsden, H., Avila, L. J., Morando, M., De la Riva, I. J., Victoriano Sepulveda, P., Rocha, C. F. D., Ibarngüengoytía, N., Aguilar Puntriano, C., Massot, M., Lepetz, V., Oksanen, T. A., Chapple, D. G., Bauer, A. M., Branch, W. R., Clobert, J. & Sites, J. W. (2010). Erosion of lizard diversity by climate change and altered thermal niches. *Science (New York, N.Y.)*, *328*(5980), 894–9.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, *175*(1), 184–191.
- Šinko, G., Vinković Vrček, I., Goessler, W., Leitinger, G., Dijanošić, A. & Miljanić, S. (2014). Alteration of cholinesterase activity as possible mechanism of silver nanoparticle toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, *21*(2), 1391–1400.
- Skalska, J. & Strużyńska, L. (2015). Toxic effects of silver nanoparticles in mammals – does a risk of neurotoxicity exist? *Folia Neuropathologica*, *4*, 281–300.
- Skibinski, D. O., Gallagher, C. & Beynon, C. M. (1994). Sex-limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics*, *138*(3), 801–9.
- Skibinski, D. O. F., Ahmad, M. & Beardmore, J. A. (1978). Genetic evidence of naturally occurring hybrids between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Evolution*, *32*(2), 354–364.

- Skibinski, D. O. F., Beardmore, J. a. & Cross T.F. (1983). Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae; Mollusca) in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society*, 19(2), 137–183.
- SKIBINSKI, D. O. F. & RODERICK, E. E. (1991). Evidence of selective mortality in favour of the *Mytilus galloprovincialis* Lmk phenotype in British mussel populations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 42(3), 351–366.
- Sloman, K. A. & McNeil, P. L. (2012). Using physiology and behaviour to understand the responses of fish early life stages to toxicants. *Journal of fish biology*, 81(7), 2175–98.
- Smaal, A. C. (2002). European mussel cultivation along the Atlantic coast : production status, problems and perspectives. *Hydrobiologia*, 484, 89–98.
- Smith, C. J., Shaw, B. J. & Handy, R. D. (2007). Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) : Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 82(2), 94–109.
- Snelgrove, P. V. R. (1999). Getting to the Bottom of Marine Biodiversity : Sedimentary Habitats. *BioScience*, 49(2), 129.
- Sokolova, I. I. M. & Lannig, G. (2008). Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms : implications of global climate change. *Climate Research*, 37(September), 181–201.
- Sokolova, I. M. & Pörtner, H. O. (2007). The role of thermal environment in stress adaptation and tolerance : Integration of multiple stressors. *Journal of Thermal Biology*, 32(3), 117.
- Somero, G. N. (2002). Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals : Optima, limits, and costs of living. *Integrative and Comparative Biology*, 42(4), 780–789.
- Somero, G. N. (2012). The Physiology of Global Change : Linking Patterns to Mechanisms. *Annual Review of Marine Science*, Vol 4, 4(January 2012), 39–61.
- Spector, M. P., Aliabadi, Z., Gonzalez, T. & Foster, J. W. (1986). Global control in *Salmonella typhimurium* : Two-dimensional electrophoretic analysis of starvation-, anaerobiosis-, and heat shock-inducible proteins. *Journal of Bacteriology*, 168(1), 420–425.
- Sprague, J. & Ramsay, B. (1965). Lethal levels of mixed copper-zinc solution for juveniles salmon. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 22, 425–432.

- Sprung, M. (1984). Physiological energetics of mussel larvae (*Mytilus edulis*). I. Shell growth and biomass. *Marine Ecology Progress Series*, 17, 283–293.
- Stachowicz, J. J., Terwin, J. R., Whitlatch, R. B. & Osman, R. W. (2002). Linking climate change and biological invasions : Ocean warming facilitates nonindigenous species invasions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15497–500.
- Steffen, W., Grinevald, J., Crutzen, P. & McNeill, J. (2011). The Anthropocene : conceptual and historical perspectives. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, 369(1938), 842–67.
- Stronkhorst, J., Ciarelli, S., Schipper, C. a., Postma, J. F., Dubbeldam, M., Vangheluwe, M., Brils, J. M. & Hooftman, R. (2004). Inter-laboratory comparison of five marine bioassays for evaluating the toxicity of dredged material. *Aquatic Ecosystem Health Management*, 7(1), 147–159.
- Suárez, M., Esteban-Tejeda, L., Malpartida, F., Fernández, A., Torrecillas, R. & Moya, J. S. (2010). Biocide activity of diatom-silver nanocomposite. *Materials Letters*, 64(19), 2122–2125.
- SUÁREZ, M. P., ALVAREZ, C., MOLIST, P. & JUAN, F. S. (2005). PARTICULAR ASPECTS OF GONADAL CYCLE AND SEASONAL DISTRIBUTION OF GAMETOGENIC STAGES OF MYTILUS GALLOPROVINCIALIS CULTURED IN THE ESTUARY OF VIGO. *Journal of Shellfish Research*, 24(2), 531–540.
- Sutherland, B., Stewart, D., Kenchington, E. R. & Zouros, E. (1998). The fate of paternal mitochondrial DNA in developing female mussels, *Mytilus edulis* : Implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genetics*, 148(1), 341–347.
- Swasey, S. M., Leal, L. E., Lopez-Acevedo, O., Pavlovich, J. & Gwinn, E. G. (2015). Silver (I) as DNA glue : Ag(+)-mediated guanine pairing revealed by removing Watson-Crick constraints. *Scientific reports*, (April), 5 :10163.
- Szczypkas, M. S., Wemmiep, J. A., Moye-rowley, W. S. & Thielesn, J. (1994). AYeast Metal Resistance Protein Similar to Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) and Multidrug Resistance-associated Protein. *Biological Chemistry*, 269, 22853–22857.
- Taleb, Z. M., Benghali, S., Kaddour, A. & Boutiba, Z. (2007). Monitoring the biological effects of pollution on the algerian west coast using mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Oceanologia*, 49(4), 543–564.

- Thorson, G. (1950). Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biological Reviews*, *25*(1), 1–45.
- Tilton, F. A., Bammler, T. K. & Gallagher, E. P. (2011). Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *153*(1), 9–16.
- Tomanek, L. (2010). Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species' biogeographical distribution ranges and metabolic costs. *Journal of Experimental Biology*, *213*(6), 971–979.
- Tomanek and Zuzow (2010). The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress : implications for thermal tolerance limits and metabolic costs of thermal stress. *The Journal of experimental biology*, *213*(Pt 20), 3559–74.
- Toonen, R. J. & Pawlik, J. R. (2001). Foundations of gregariousness : A dispersal polymorphism among the planktonic larvae of a marine invertebrate. *Evolution*, *55*(12), 2439–2454.
- Toro, J. E., Thompson, R. J. & Innes, D. J. (2002). Reproductive isolation and reproductive output in two sympatric mussel species (*Mytilus edulis*, *M. trossulus*) and their hybrids from Newfoundland. *Marine Biology*, *141*(5), 897–909.
- Treut, L., Somerville, R., Cubasch, U., Ding, Y., Mauritzen, C., Mokssit, a., Peterson, T., Prather, M., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K. B. & Tignor, M. (2007). Historical Overview of Climate Change Science. *Earth, Chapter 1*(October), 93–127.
- Tueros, I., Rodríguez, J. G., Borja, A., Solaun, O., Valencia, V. & Millán, E. (2008). Dissolved metal background levels in marine waters, for the assessment of the physico-chemical status, within the European Water Framework Directive. *Science of the Total Environment*, *407*(1), 40–52.
- Uller, T. (2008). Developmental plasticity and the evolution of parental effects. *Trends in Ecology and Evolution*, *23*(8), 432–438.
- U.S DHHS (2004). Toxicological profile for Copper. *U.S Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, (September), 121–189.
- USEPA (2004). Risk assessment guidance for superfund (RAGS). Volume I. Human health evaluation manual (HHEM). Part E. Supplemental guidance

- for dermal risk assessment USEPA, 2004. Risk assessment guidance for superfund (RAGS). Volume I. Human health evaluation manual (H. *US Epa*, 1(540/R/99/005), 1–156.
- USEPA, U. S. E. P. A. (2014). Priority Pollutant List (p.2).
- Väinölä, R. & Strelkov, P. (2011). *Mytilus trossulus* in Northern Europe. *Marine Biology*, 158(4), 817–833.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178–189.
- Van der Oost, R., Beyer, J. & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : A review.
- Van der Schalie, W. H., Shedd, T. R., Knechtges, P. L. & Widder, M. W. (2001). Using higher organisms in biological early warning systems for real-time toxicity detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(7-8), 457–465.
- Vargas-Yañez, M., Zunino, P., Benali, A., Delpy, M., Pastre, F., Moya, F., García-Martínez, M. d. C. & Tel, E. (2010). How much is the western Mediterranean really warming and salting? *Journal of Geophysical Research*, 115(C4), C04001.
- Vasseur, P. & Cossu-Leguille, C. (2003). Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International*, 28(8), 711–717.
- Vazquez, D. (2005). K.J. Gaston, *The Structure and Dynamics of Geographic Ranges*, Oxford University Press, ISBN 0-19-852640-7, £66 (hardback), ISBN 0-19-852641-5, £27.50 (paperback), 2003 p. 266. Vazquez2005649649D. *Biological Conservation*, 122(4), 649–649.
- Verlecar, X. N., Jena, K. B. & Chainy, G. B. N. (2007). Biochemical markers of oxidative stress in *Perna viridis* exposed to mercury and temperature. *Chemico-Biological Interactions*, 167(3), 219–226.
- Verween, A., Vincx, M. & Degraer, S. (2007). The effect of temperature and salinity on the survival of *Mytilopsis leucophaeata* larvae (Mollusca, Bivalvia) : The search for environmental limits. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 348(1-2), 111–120.
- Viarengo, A. (1989). Heavy metals in marine invertebrates : mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.*, 1, 295–317.

- Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F., Marro, A. & Fabbri, R. (1999). Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 4(6), 455–66.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E. & Koehler, A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring : a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology pharmacology : CBP*, 146(3), 281–300.
- Viarengo, A., Mancinelli, G., Orunesu, M., Martino, G., Faranda, F. & Mazzucotelli, A. (1988). Effects of sublethal copper concentrations, temperature, salinity and oxygen levels on calcium content and on cellular distribution of copper in the gills of *Mytilus galloprovincialis* lam. : A multifactorial experiment. *Marine Environmental Research*, 24(1-4), 227–231.
- Viarengo, A. & Nott, J. (1993). Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Comparative Pharmacology*, 104(3), 355–372.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F. & Fabbri, R. (1997). A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms : an application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Marine Environmental Research*, 44(1), 69–84.
- Villalba, A. (1995). Gametogenic cycle of cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in the bays of Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture*, 130(2-3), 269–277.
- Vindimian, E. (2005). MSEXcel macro REGTOX EV7.0.5.xls.
- Vinot, I. & Pihan, J. C. (2005). Circulation of copper in the biotic compartments of a freshwater dammed reservoir. *Environmental Pollution*, 133(1), 169–182.
- Volker Loeschke & Ary A. Hoffmann (2015). Consequences of Heat Hardening on a Field Fitness Component in *Drosophila* Depend on Environmental Temperature. *The American Naturalist*.
- Vrèek, I. & Šinko, G. (2013). Inactivation of cholinesterases by silver and gold ions in vitro. *Central European Journal of Chemistry*, 11(6), 935–944.
- WADE, T., MARTIN, N. G. & TIGGEMANN, M. (1998). Genetic and environmental risk factors for the weight and shape concerns characteristic of bulimia nervosa. *Psychological Medicine*, 28(4), 761–771.

- Waeles, M., Riso, R. D., Cabon, J. Y., Maguer, J. F. & L'Helguen, S. (2009). Speciation of dissolved copper and cadmium in the Loire estuary and over the North Biscay continental shelf in spring. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *84*(1), 139–146.
- Wang, W.-X. & Fisher, N. S. (1999). Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates : A synthesis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *18*(9), 2034–2045.
- Wang, W. X. & Rainbow, P. S. (2005). Influence of metal exposure history on trace metal uptake and accumulation by marine invertebrates. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *61*(2), 145–159.
- Wang, Z., Jiang, W., Zhang, Z., Qian, M. & Du, B. (2012). Nitidine chloride inhibits LPS-induced inflammatory cytokines production via MAPK and NF-kappaB pathway in RAW 264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, *144*(1), 145–150.
- Watling, H. R. (1982). Comparative study of the effects of zinc, cadmium, and copper on the larval growth of three oyster species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *28*(2), 195–201.
- Watling, H. R. (1983). Comparative study of the effects of metals on the settlement of *Crassostrea gigas*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *31*(3), 344–351.
- Webb, N. A. & Wood, C. M. (1998). Physiological analysis of the stress response associated with acute silver nitrate exposure in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *17*(4), 579–588.
- Wedepohl, K. H. (1995). INGERSON LECTURE The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *59*(7), 1217–1232.
- Weis, J. (2014). Delayed Behavioral Effects of Early Life Toxicant Exposures in Aquatic Biota. *Toxics*, *2*(2), 165–187.
- Weis, J. S., Smith, G., Zhou, T., Santiago-Bass, C. & Weis, P. (2001). Effects of Contaminants on Behavior : Biochemical Mechanisms and Ecological Consequences. *BioScience*, *51*(3), 209.
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiol Rev*, *77*(3), 591–625.

- Wernberg, T., Russell, B. D., Thomsen, M. S., Gurgel, C. F. D., Bradshaw, C. J. A., Poloczanska, E. S. & Connell, S. D. (2011). Seaweed communities in retreat from ocean warming. *Current biology : CB*, *21(21)*, 1828–32.
- Weser, U., Younes, M., Hartmann, H.-J. & Zienau, S. (1979). X-ray photoelectron spectrometric aspects of the copper chromophore in plastocyanin. *FEBS Letters*, *97(2)*, 311–313.
- Weston, D. P., Holmes, R. W. & Lydy, M. J. (2009). Residential runoff as a source of pyrethroid pesticides to urban creeks. *Environmental Pollution*, *157(1)*, 287–294.
- Wethey, D. S., Woodin, S. A., Hilbish, T. J., Jones, S. J., Lima, F. P. & Brannock, P. M. (2011). Response of intertidal populations to climate : Effects of extreme events versus long term change. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *400(1-2)*, 132–144.
- White, S. L. & Rainbow, P. S. (1985). On the metabolic requirements for copper and zinc in molluscs and crustaceans. *Marine Environmental Research*, *16(3)*, 215–229.
- Whitehead, A., Triant, D. A., Champlin, D. & Nacci, D. (2010). Comparative transcriptomics implicates mechanisms of evolved pollution tolerance in a killifish population. *Molecular Ecology*, *19(23)*, 5186–5203.
- Wilhelm, R. & Hilbish, T. J. (1998). Assessment of natural selection in a hybrid population of mussels : Evaluation of exogenous vs endogenous selection models. *Marine Biology*, *131(3)*, 505–514.
- Williams, C. J., Mendell, E. K., Murphy, J., Court, W. M., Johnson, A. H. & Richter, S. L. (2008). Paleoenvironmental reconstruction of a Middle Miocene forest from the western Canadian Arctic. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, *261(1-2)*, 160–176.
- Williams, D. M., Wolanski, E. & Andrews, J. C. (1984). Transport mechanisms and the potential movement of planktonic larvae in the central region of the Great Barrier Reef. *Coral Reefs*, *3(4)*, 229–236.
- Willis, B. E. & Bishop, W. M. (2016). Understanding Fate and Effects of Copper Pesticides in Aquatic Systems. *Journal of Geoscience and Environment Protection*, *04(05)*, 37–42.
- Wiltshire, K. H., Malzahn, A. M., Wirtz, K., Greve, W., Janisch, S., Mangelsdorf, P., Manly, B. F. J. & Boersma, M. (2008). Resilience of North Sea phytoplankton

- spring bloom dynamics : An analysis of long-term data at Helgoland Roads. *Limnology and Oceanography*, 53(4), 1294–1302.
- Wood, C. M., Playle, R. C. & Hogstrand, C. (1999). Physiology and modeling of mechanisms of silver uptake and toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(1), 71–83.
- Woźniak, K. & Błasiak, J. (2002). Free radicals-mediated induction of oxidized DNA bases and DNA - Protein cross-links by nickel chloride. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 514(1-2), 233–243.
- Wright, D. A. & Welbourn, P. (2002). *Environmental Toxicology (Cambridge Environmental Chemistry Series) 1st Edition*.
- Wu, Y., Lin, C. & Yuan, L. (2008). Phototaxis index of *Daphnia carinata* as an indicator of joint toxicity of copper, cadmium, zinc, nitrogen and phosphorus in aqueous solutions. *Ecological Indicators*, 8(1), 69–74.
- Wurgler, F. E. & Kramers, P. G. N. (1992). Environmental effects of genotoxins (eco-genotoxicology). *Mutagenesis*, 7(5), 321–327.
- Xu, M., Jiang, L., Shen, K. N., Wu, C., He, G. & Hsiao, C. D. (2016). Transcriptome response to copper heavy metal stress in hard-shelled mussel (*Mytilus coruscus*). *Genomics Data*, 7, 152–154.
- Yao, C.-L. & Somero, G. N. (2012). The impact of acute temperature stress on hemocytes of invasive and native mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus*) : DNA damage, membrane integrity, apoptosis and signaling pathways. *The Journal of experimental biology*, 215(Pt 24), 4267–77.
- Yaroslavtseva, L. M. & Sergeeva, E. P. (2006). Adaptivity of the bivalve *Mytilus trossulus* larvae to short- and long-term changes in water temperature and salinity. *Russian Journal of Marine Biology*, 32(2), 82–87.
- Zhang, S., Liu, L., Pareek, V., Becker, T., Liang, J. & Liu, S. (2014). Effects of broth composition and light condition on antimicrobial susceptibility testing of ionic silver. *Journal of Microbiological Methods*, 105, 42–46.
- Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B. & Hung, M. C. (2001). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nature cell biology*, 3(11), 973–982.
- Zoto, G. A. & Robinson, W. E. (1985). The toxicity of one-hour silver exposures to early-life stages of the surf *Spisula solidissima* (Dillwyn). *Marine Environmental Research*, 16(1), 61–75.

- Zouros, E., Oberhauser Ball, A., Saavedra, C. & Freeman, K. R. (1994). An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(16), 7463–7.
- Zuiderveen, J. & Birge, W. (1996). The comparative toxicity of silver to aquatic biota.