

FACULTE DES SCIENCES
AIX MARSEILLE UNIVERSITE
ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT (ED 251)

ETUDE DE L'OCCURRENCE ET DE L'IMPACT DES SOUS-PRODUITS DE CHLORATION DU GOLFE DE FOS

Thèse présentée et soutenue à Marseille par

Karine Lebaron

Le 10 janvier 2019

En vue d'obtenir le grade de Docteur de l'Université d'Aix-Marseille

JURY

Catherine MOUNEYRAC	Professeure – Université Catholique de l'Ouest	Rapporteur
Yves LEVI	Professeur – Université Paris Sud	Rapporteur
Aurore ZALOUK-VERGNOUX	Maitre de conférences – Université de Nantes	Examinatrice
Sonia TERNENGO	Maitre de conférences – Université de Corse	Examinatrice
Jean-Luc BOUDENNE	Professeur – Université Aix Marseille	Directeur
Stéphane COUPE	Maitre de conférences – Université de Toulon	Co-directeur
Julien DRON	Institut écocitoyen pour la connaissance des pollutions	Invité

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée en parallèle avec l'université Aix Marseille, au sein de l'équipe TRAME du Laboratoire Chimie de l'Environnement (LCE) et l'université de Toulon, au sein de l'équipe EMBIO de l'Institut Méditerranéen d'Océanologie (MIO). Et pour commencer je tiens à remercier Catherine Mouneyrac et Yves Lévi d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, ainsi que Aurore Zalouk-Vergnoux et Sonia Ternengo d'être examinatrices de mon travail.

Je remercie mon directeur de thèse, le Professeur Jean-Luc Boudenne pour la confiance qu'il m'a accordé en me choisissant pour ce projet. Merci de m'avoir accueillie au sein de l'équipe TRAME, merci pour ton ambition qui nous aura bien fait voyager.

Mille mercis à Carine Demelas, ma cops! Ma covoitureuse, mon binôme de campagne en mer, mon double prénom. Merci tout simplement d'avoir été là, de m'avoir tant aidée, tant conseillée. Merci pour ton savoir-faire, merci pour toutes ces longues journées de manips, merci pour tous nos bons moments, de partage, de fou rire, de ragots. Merci de m'héberger, de me nourrir, de nourrir Opale, de garder mes meubles, de tout en fait... Je n'ai pas d'autre mot, merci pour ton accompagnement pendant ces 3 ans.

Merci également à Tarek Manasfi, de m'avoir formée aux techniques analytiques, d'avoir inauguré cette thèse finalement. A tous nos bons moments à Marseille, Orlando, Cuba, Finlande. Ça a été un réel plaisir de partager tout ça, j'espère qu'on se recroisera. Une pensée également à Laurent Vassalo, pour ta bonne humeur, pour ton côté décalé qui nous aura bien fait rire. Merci pour ton aide indispensable tout au long de ce projet. Merci à Etienne Quivet, pour son avis extérieur toujours bienvenue. Merci pour tous tes conseils pas toujours pertinents, mais toujours avec bon cœur... départ Port Saint-Louis, MERCI !

Je remercie chaleureusement tous les membres du LCE, notamment Laurence Coulomb, pour m'avoir supportée administrativement ce qui n'a pas toujours été simple... C'était un vrai régal de travailler avec toi. Mais également tous les autres, pour leur accueil et leur bonne humeur.

Maintenant je voudrais remercier Stéphane Coupé pour avoir co-encadré cette thèse. Merci de m'avoir ouvert le monde de la biologie, et de m'avoir appris tant de choses qui n'étaient pas gagnées ! Merci pour ton aide, ton écoute et toutes tes relectures.

Une mention spéciale pour toi, Sandrine Gaillard ! Tu as été plus qu'une aide pour moi, un pilier, une amie. L'écriture n'est pas ma qualité première, mais j'essaye quand même de te faire un joli hommage parce que tu as été une véritable force durant ces 3 ans, alors de tout cœur, merci. Merci pour tous tes conseils, tes idées lumineuses, pour ton soutien sans faille. Merci d'avoir partagé ton bureau avec moi, merci pour ton écoute, ton sourire et tous ces bons moments passés ensemble. Un grand merci également à ma copine Emilie Pas-zéro, fraîchement catalane ! Merci de m'aider à être plus polie quotidiennement

et plus sociable, qu'est-ce que j'aurai fait sans toi. De nouvelles aventures nous attendent dans le 66 ! Vous avez été un super trinôme de badminton-neuses et vive le sport !

Je remercie également toute l'équipe EMBIO-Toulon si petite et si familiale, qui aura été pour moi une véritable bouffée d'oxygène, merci à Simone et Nathalie pour votre bienveillance, votre soutien, vos corrections, votre aide et votre bonne humeur quotidienne. Merci également à Benjamin Misson, ce fut un régal de partager ce projet. Merci pour ton écoute et ton aide. Mais également à mes petites mains, mes stagiaires qui m'auront bien aidé, Lilia, Maryem et Justine, merci à vous. Une petite dédicace à ma copine Aurélie, la belle rencontre. Quel dommage qu'on n'ait pas commencé nos thèses en même temps !

Et pour finir mes remerciements professionnels, sincèrement merci à tout l'institut écocitoyen sans qui toutes nos campagnes en mer n'auraient pas eu lieu et toutes mes plongées oursins non plus. Merci à tous, Julien particulièrement mais aussi Annabelle et Charles, mes plongeurs préférés. Merci à Gautier, Marine, Véro, et tous les autres. Merci pour toutes ces sorties terrains pas toujours dans les meilleures conditions mais toujours de bonne humeur, surtout l'équipe plongeurs merci de vous être gelés pour ma science !

Je remercie tous mes amis de m'avoir soutenue et aidée. Merci de me changer les idées quand il le faut et d'être une véritable source de bonheur. Particulièrement Magali, tu m'as ouvert les portes de R, tu m'as juste sauvée la vie, rien que ça ! Merci pour tout en fait, de m'avoir passionnée de poissons, d'oiseaux, pas encore de plantes et d'insectes, faut pas abuser des bonnes choses ! Merci de me rendre la vie plus douce. Vivement notre chômage mutuel, ça a du bon les longues études !

Un grand merci à mes parents de m'avoir toujours donné les moyens d'aller au bout de mes projets, de mes études, de m'avoir donné le gout aux sciences. Merci à toute ma famille, pour votre curiosité, votre soutien et votre bonne humeur. Merci d'être si aimant, vous avez été une véritable force. Une mention spéciale tout de même à ma maman, sans qui je n'aurai jamais terminé cette fichue thèse. Merci tellement d'avoir été là à chaque fois, sans faille, dans tous mes déménagements (et il y en a eu...), toutes mes baisses de régimes (et il y en a eu...), merci pour cette patience, pour ta force de caractère et pour tout ton amour.

Un merci atypique mais sincère à mon petit minouche Le Poup qui m'a tellement tenu compagnie et à ma douce Opale ma fidèle partenaire depuis 10 ans. Merci de me changer les idées, merci pour vos câlins, votre énergie.

And last but not least, Mathieu. Merci pour ta patience, pour ton amour quotidien, pour tout ce que tu as fait. Merci de me porter si souvent et de m'apporter tant d'équilibre.

A toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail, mille mercis.

« Quand le dernier arbre aura été abattu,
quand la dernière rivière aura été empoisonnée,
quand le dernier poisson aura été pêché,
alors on saura que l'argent ne se mange pas. »

Geronimo (1829-1909)

LISTE DES PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS

Articles

Lebaron K, Mechiri L, Richard S, Austruy A, Boudenne J-L, Coupé S (2019) Assessment of individual and mixed toxicity of bromoform, tribromoacetic-acid and 2,4,6 tribromophenol, on the embryo-larval development of *Paracentrotus lividus* sea urchin. *Environmental Science Pollution Research* 26(20),20573–20580.
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-05279-8>

Manasfi T, Lebaron K, Verlande M, Dron J, Demelas C, Vassalo L, Revenko G, Quivet E, Boudenne J-L (2018) Occurrence and speciation of chlorination byproducts in marine waters and sediments of a semi-enclosed bay exposed to industrial chlorinated effluents. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 222:1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.06.008>

Liste des communications

Lebaron, K., Coupe, S., Demelas, C., Vassalo, L., Boudenne, J-L. 2019 - Gene expression variation between two populations of *Paracentrotus lividus*. SETAC Europe 29th annual meeting, poster corner session, 26-30 mai 2019, Helsinki (Finland)

Lebaron, K., Dron, J., Verlandes, M., Misson, B., Boudenne, J-L. 2018 - Assessment of the environmental risk related to biofouling control in the Mediterranean coastal zone. Public restitution, 10 décembre 2018, Fos-sur-Mer (France)

Lebaron, K., Coupe, S., Boudenne, J-L. 2018 - Occurrence et impacts écotoxicologiques des composés organobromés dans le milieu marin. 25^{ième} Congrès des doctorants (ED 251), 17-18 avril 2018, La Timone Marseille (France)

Lebaron, K., Coupe, S., Manasfi, T., Boudenne, J-L. 2018 - Assessing the occurrence of disinfection by-products from chlorinated industrial discharges and their toxicity on *Paracentrotus lividus*. The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, 25 février-1^{er} mars 2018, Orlando (United States).

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES	<i>i</i>
LISTE DES TABLEAUX	<i>iii</i>
OBJECTIFS SCIENTIFIQUES	1
INTRODUCTION	3
CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique - Les sous-produits de chloration dans le monde	7
1. Source, nature et niveau des contaminations aux DBPs	8
1.1. Différentes sources possibles	8
1.1.1. La production dite « naturelle » par les organismes marins	8
1.1.2. Les sources anthropiques des sous-produits de chloration dans le milieu marin	9
1.2. Nature et niveaux des concentrations environnementales	14
1.2.1. Milieux aquatiques	14
1.2.2. Réseau trophique	16
2. L'actualité des DBPs	16
2.1. Risques associés aux DBPs en santé publique	16
2.2. La réglementation sanitaire des DBPs	19
2.3. Réglementation environnementale	19
3. Évaluation de la toxicité et des perturbations induites par les DBPs dans l'environnement	20
3.1. Les biomarqueurs	20
3.1.1. Les variations phénotypiques	21
3.1.2. Les variations biochimiques	21
3.1.3. Dommages de l'ADN	25
3.1.4. Expression de gènes	26
3.2. Les organismes modèles	27
4. Le site d'étude : le golfe de Fos	30
CHAPITRE 2 : Identification du niveau de pollution dans le golfe de Fos	33
1. Les sous-produits de chloration dans le milieu marin, méthodes d'analyses	34
2. Matériels et méthodes	34
2.1. Le déroulement des campagnes	34
2.1.1. Les campagnes « eau »	34
2.1.2. La campagne « sédiment »	37
2.1.3. Les campagnes de prélèvement d'oursin	37
2.2. Méthodes analytiques	38
2.2.1. Extraction des composés à partir de la matrice d'eau	39
2.2.2. Préparation des échantillons de sédiment	40
2.2.3. Extraction des phénols pour les oursins	41
2.2.4. Méthodes analytiques	41
2.3. Analyses statistiques	44
3. Résultats et discussion	44
3.1. Distribution des sous-produits de chloration dans l'eau	44
3.1.1. Diversité des sous-produits de chloration	44
3.1.2. Influence des paramètres environnementaux sur la formation des DBPs	50
3.2. Niveau de pollution dans les sédiments du golfe	56
3.3. Niveau de pollution des oursins du golfe	57

4. Conclusion	60
CHAPITRE 3 : Impact des sous-produits de chloration	61
1. Introduction	62
2. Mise en pratique	64
2.1. Prélèvement et quantification des communautés planctoniques	64
2.2. Production de larves d'oursin et conception expérimentale	65
2.2.1. Produits chimiques	66
2.2.2. Evaluations toxicologiques	66
2.2.3. Détermination du stress oxydant	67
2.2.4. Test de génotoxicité	71
2.3. Analyses statistiques	73
3. Résultats	73
3.1. Evaluation de l'impact in vivo des rejets chlorés industriels sur les communautés picoplanctoniques locales.	73
3.2. Évaluation de la toxicité in-vitro du BMF, du TBAA et du TBP sur le développement embryonnaire d'oursin	78
3.3. Evaluation du stress oxydant associé aux DBPs	81
3.4. Évaluation de la génotoxicité du mélange	82
4. Conclusion	85
CHAPITRE 4 : Adaptation locale des oursins issus du golfe de Fos	87
1. Introduction	88
2. Plan d'expérience	90
2.1. Protocole opératoire	90
2.2. De l'extraction des ARN totaux à la quantification des ARNm suivis	93
2.3. Les gènes étudiés	94
2.4. Statistiques	95
3. Résultats et discussion	95
3.1. Le cas des témoins négatifs	95
3.2. Zoom sur l'abondance des métallothionéines	97
3.3. Le cas des larves challengées par différents niveaux de pollution	98
3.4. Influence de la nature de la pollution	103
4. Conclusion	105
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	107
BIBLIOGRAPHIE	113
ANNEXES	139
Annexe 1 : Photos de larves d'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	I
Annexe 2 : Publication, campagne 1	I
Annexe 3 : Publication, écotoxicologie	III

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Diagramme potentiel-pH du brome _____	5
Figure 2 : Plan d'attaque pour caractériser le stress _____	6
Figure 3 : Cartographie des centrales électriques dans le monde _____	10
Figure 4: Principe de chloration dans les échangeurs thermiques industriels _____	12
Figure 5 : Schéma des différentes formes de ROS _____	23
Figure 6 : Schéma des différentes étapes de la peroxydation lipidique _____	24
Figure 7 : Structure d'une comète _____	26
Figure 8 : Principe de l'expression génique (cas d'un gène codant pour une protéine) _____	27
Figure 9 : Cartographie du golfe de Fos. _____	30
Figure 10 : Concentration en zinc dans le golfe de Fos selon Benon et al. 1978 _____	31
Figure 11 : Mesure du courant en surface et en profondeur (maximum 7m) pour chaque campagne. _____	36
Figure 12 : Cartographie des points de prélèvement dans le golfe de Fos sur Mer. _____	36
Figure 13 : Six différents points de prélèvement d'oursins _____	38
Figure 14: Distribution de la pollution en sous-produits de chloration (A) et en composés organohalogénés totaux (B) en fonction des sites de prélèvement pour les 6 campagnes. _____	46
Figure 15 : Niveau de pollution aux DBPs en fonction des campagnes. _____	48
Figure 16 : Liste des DBPs formés aux exutoires _____	49
Figure 17: Paramètres physico-chimiques en fonction des campagnes _____	50
Figure 18 : Niveaux de pollution pour les différentes familles de DBPs, THM, HAA et HAN en fonction des campagnes et des sites de prélèvement. _____	51
Figure 19 : Modèle de salinité en Méditerranée le 7 novembre 2018, jour de la campagne n°5 _____	52
Figure 20 : Analyse en composante principale sur l'ensemble des données des campagnes _____	53
Figure 21 : Classification descendante hiérarchique sur l'ensemble des données des campagnes _____	54
Figure 22 : Boxplot des concentrations en DBPs trouvées selon les sites et les campagnes _____	55
Figure 23: Interpolation spatiale de la distribution de la pollution en DBPs à la surface du golfe lors des 6 campagnes _____	56
Figure 24 : Concentrations ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids sec) dans les oursins selon leur localisation dans le Golfe de Fos _____	59
Figure 25 : Cascade de production des principales espèces réactives de l'oxygène, selon Favier (1997) _____	68
Figure 26 : Réactions chimiques impliquées dans la mesure du NO_2^- à l'aide du système de réactifs de Griess _____	69
Figure 27: Principe du traitement des lames pour le test des comètes _____	71
Figure 28: Principe d'évaluation de la comète _____	72
Figure 29: Représentation graphique de l'analyse de redondance des variables abiotiques expliquant la distribution des données biologiques. _____	74
Figure 30 : Contribution de chaque groupe à la variabilité biologique, toutes campagnes confondues. _____	75
Figure 31 : Représentation des analyses de redondance pour chaque campagne, différenciant les sites de prélèvement. _____	76

<i>Figure 32 : Courbe dose-réponse pour les trois molécules testées</i>	78
<i>Figure 33 : Effet du bromoforme (rose), tribromophénol (bleu) et de l'acide tribromoacétique (orange) seul et en cocktail de LOECs (gris), sur le pourcentage de larves Pluteus bien développées issus d'adultes pêchés dans le golfe de Fos (site pollué, PS) et d'un site non pollué (NPS), après 48 heures d'exposition</i>	80
<i>Figure 34 : Evolution des espèces antioxydantes des larves Pluteus à la suite d'une exposition de 48 heures aux LOECs des différents DBPs (à gauche) et l'évolution de deux oxydants (à droite).</i>	81
<i>Figure 35 : Distribution de l'OTM (a) et du % d'ADN dans la queue de la comète (b) en fonction du niveau d'exposition des larves de Pluteus au mélange chimique.</i>	84
<i>Figure 36 : Les différentes approches « -omics »</i>	89
<i>Figure 37 : Photos des conditions d'aquaculture. A : ponte des oursins ; B : bassins de 80L</i>	91
<i>Figure 38 : Résumé du plan expérimental suivi. 3 expositions différentes ont été entreprises pour chaque site géographique étudié.</i>	92
<i>Figure 39 : Zoom sur le taux de transcrit de 3 métallothionéines retrouvé dans les larves de Fos (gris) et les larves de Calvi (rouge).</i>	98
<i>Figure 40 : Analyse en composantes principales du taux de transcrits des différents gènes (variables) et la répartition des individus en fonction de leur site géographique, après 48 h d'exposition à l'eau réelle de Fos et au cocktail de DBPs.</i>	99
<i>Figure 41 : Analyse en composantes principales du taux de transcrits des différents gènes (variables) et la répartition des individus en fonction de leur site géographique, après 96 hpf d'exposition à l'eau réelle de Fos et au cocktail de DBPs</i>	101
<i>Figure 42 : Analyse en composante principale pour chaque site géographique en fonction de la pollution, ainsi que la contribution aux axes des variables</i>	104

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de quelques représentants des principales familles de DBPs</i>	15
<i>Tableau 2 : Tableau récapitulatif réalisé par Richardson et al 2007, sur les sous-produits de chloration retrouvés dans les eaux destinées à la consommation humaine et leur toxicité associée.</i>	17
<i>Tableau 3 : Récapitulatif des conditions météorologiques de chaque campagne</i>	35
<i>Tableau 4 : Liste des échantillons prélevés pour l'analyse des sédiments</i>	37
<i>Tableau 5 : Programmes de détection en GC-ECD en fonction des familles analysées</i>	42
<i>Tableau 6 : Paramètres de qualité analytique</i>	43
<i>Tableau 7 : Proportions des différentes familles de DBPs par rapport aux composés organohalogénés totaux mesurés</i>	47
<i>Tableau 8 : Valeurs moyennes et écarts-types en µg/kg des concentrations dans les oursins pour chaque zone d'étude</i>	58
<i>Tableau 9 : Les différentes valeurs de toxicité pour les trois DBPs étudiés</i>	79
<i>Tableau 10 : Concentrations des différents ETM utilisées pour les expositions des témoins positifs</i>	92
<i>Tableau 11 : Programme du LightCycler 480</i>	93
<i>Tableau 12 : Liste des gènes étudiés et leur fonction</i>	94
<i>Tableau 13 : Fluctuations d'abondance des transcrits selon le stade de développement.</i>	96
<i>Tableau 14 : Profil d'expression pour les larves témoins âgées de 48h et de 96h.</i>	97
<i>Tableau 15 : Contribution des variables et des individus aux deux axes pour les expositions 48 hpf</i>	101
<i>Tableau 16 : Contribution des variables et des individus aux deux axes pour les expositions 96 hpf</i>	102

OBJECTIFS SCIENTIFIQUES

Différents objectifs forment le fil conducteur de cette thèse.

- ⊗ Le premier objectif est d'identifier les sous-produits de chloration formés, de déterminer les conditions nécessaires à leur formation et de quantifier le niveau de contamination du golfe de Fos en sous-produits de chloration. L'objectif du projet *in fine*, est d'arriver à modéliser en fonction des conditions physico-chimiques le devenir de la pollution en DBPs du golfe.
- ⊗ Un second objectif est de caractériser l'impact de cette pollution sur le vivant. D'une part, l'influence de la contamination aux DBPs sur la distribution de communautés planctoniques clés dans le golfe a été évaluée. D'autre part, des analyses sur le modèle animal oursin (*Paracentrotus lividus*), ont été réalisées afin d'établir la toxicité des trois principaux DBPs observés dans le golfe ; d'évaluer de potentielles différences de réponse transcriptomique, dans la mise en place d'une réponse au stress de différentes populations au trait d'histoire de vie contrasté pour l'exposition aux DBPs, et enfin de rechercher des régions génomiques potentiellement sélectionnées par le milieu, favorisant la survie dans le golfe.
- ⊗ L'objectif final étant de mieux comprendre et prédire la pollution aux DBPs dans le golfe, ainsi que la pression exercée par cette pollution dans un contexte de multi-pollutions sur la faune endémique.

INTRODUCTION

L'océan mondial représente 71% de la superficie globale, avec une profondeur moyenne de 3800m, le plaçant plus vaste milieu de vie planétaire. Il tient un rôle primordial pour le climat en régulant ce dernier via les transferts océaniques de chaleur et en participant aux grands cycles biogéochimiques tel que celui du carbone. Depuis les débuts de la révolution industrielle les émissions de dioxyde de carbone n'ont cessé d'augmenter. Les activités humaines sont mises en cause, définissant ainsi l'ère de l'anthropocène, aboutissant à une dispersion croissante des molécules synthétisées par l'homme qui terminent leur parcours dans les sols, les rivières, l'atmosphère et finalement l'océan, le réceptacle ultime (Asimov and Pohl 1991). Ce n'est que dans les années 50 que l'on a réalisé que les capacités d'épuration des océans étaient fortes mais pas infinies. La première convention internationale pour la prévention de la pollution des eaux de mer par les hydrocarbures a vu le jour en 1954 (Convention OILPOL). Malgré une prise de conscience de plus en plus vive des populations face à la pollution, force est de reconnaître que les pratiques ont du mal à évoluer face aux enjeux économiques et sociétaux actuels. Selon l'UNESCO, 80% des pollutions océaniques sont aujourd'hui d'origine terrestre, et par ordre d'importance relèvent des pollutions plastiques, agricoles, industrielles et sonores (Boughriet 2011).

Parmi les pollutions industrielles, on retrouve la désinfection des eaux marines, notamment dans les circuits ouverts d'échange thermique industriels. Tous les systèmes d'échange thermique des installations industrielles utilisant de l'eau de mer sont affectés par le développement excessif d'organismes marins qui perturbent, voire arrêtent leur fonctionnement. En effet, les conditions de croissance dans les circuits de refroidissement sont particulièrement favorables aux organismes sessiles avec des conditions d'écoulement régulier fournissant une abondance de nourriture tout en limitant la présence de prédateurs. Une telle croissance, appelée macro-encrassement, peut être massive ; elle peut restreindre l'écoulement, bloquer partiellement ou totalement les condenseurs et les échangeurs de chaleur. D'autre part, les surfaces des échangeurs peuvent être recouvertes de biofilm produit par des bactéries marines. La désinfection permet de limiter ce développement de macro et micro-fouling, afin d'assurer le bon rendement de ces échangeurs (Jenner et al. 1996).

Cette pratique est également largement répandue pour traiter les eaux de ballast et ainsi limiter les risques de contamination inter-océan liés aux trafics maritimes. De nombreux organismes marins transitent via ces navires d'océan en océan, tels que des microalgues, du plancton, des mollusques ou des bactéries (Hwang et al. 2018; Hess-Erga et al. 2019). Depuis le 8 septembre 2017, l'organisation maritime internationale (OMI) a imposé le nettoyage des eaux de ballast via une convention signée par près de cinquante-deux pays (Debrincat 2017). La désinfection des eaux de ballast est le moyen le plus rapide et efficace pour pallier l'invasion des espèces indigènes, la disparition de la diversité endémique et plus globalement le risque de déséquilibre des écosystèmes marins (Hernandez et al. 2017). La vidange des eaux de ballast libère de grandes quantités d'eau traitée dans le milieu marin. La désinfection de l'eau de mer intéresse aussi d'autres activités telles que l'aquaculture ou le traitement tertiaire des stations d'épuration, lesquelles contribuent, bien que dans une moindre mesure, à cette pollution (Krasner et al. 2009; Hladik et al. 2014).

Plusieurs moyens existent pour désinfecter l'eau de mer comme l'électro chloration, la chloration, l'ozonation. Cependant l'utilisation du chlore gazeux reste la technique d'oxydation la plus utilisée par les industriels, car moins coûteuse et d'une mise en œuvre facile (Rajagopal et al. 2012). Ces procédés aboutissent à la formation de sous-produits de chloration appelés DBPs (disinfection by-products).

La concentration de molécule active ajoutée au milieu ainsi que les paramètres physico-chimiques du milieu, tels que la salinité, le pH, la température, la concentration en matière organique, influencent le niveau de diversité des DBPs formés. Par conséquent, la nature et l'abondance des DBPs produits varient en fonction des modalités de chloration et des environnements. Cependant, les DBPs observés dans le milieu ne sont pas uniquement le résultat de l'activité humaine, une partie est naturellement produite. Plus de 5 000 composés organohalogénés ont été décrits comme issus d'organismes marins (Gribble 2010). La compétition entre les organismes marins pour la ressource a entraîné l'émergence de plusieurs molécules de défense contenant des halogènes. Ce mécanisme est mis en place notamment par les algues pour lutter contre les microorganismes pathogènes, ou les prédateurs. Ainsi, le bromoforme est le DBP le plus abondamment retrouvé dans l'environnement marin, avec une production naturelle mondiale estimée à 10^5 tonnes par an (Quack et al. 2004; Warwick et al. 2006; Butler et al. 2007; Stemmler et al. 2015). Pour autant, la source principale de bromoforme reste

anthropique. Quack et al. (2004) estiment la quantité mondiale de DBPs dans les océans à plus de 100 millions de tonnes, l'essentiel provenant des sites industriels (env. 98%), le reste étant issus des eaux de ballasts. Les teneurs environnementales moyennes sont comprises entre 10 et 50 µg/L dans les sites pollués correspondant à environ 1 000 fois la concentration naturelle (Quack et al. 2004).

La durée de vie des oxydants chimiques pendant les processus de désinfection dépend principalement des réactions avec la matière organique dissoute (DOM – dissolved organic matter), naturellement présente dans toutes les eaux. Typiquement, plus de 99% de la dose d'oxydant appliquée réagit avec la DOM et forme ainsi des sous-produits de chloration spécifiques de l'oxydant (DBPs). En outre, les réactions des oxydants chimiques avec les bromures et/ou les iodures naturels ou d'origine anthropique peuvent conduire à une spéciation différente des DBPs formés. Après les premières découvertes de Rook et al. (1974) sur les DBPs, des recherches ont été menées pour comprendre les processus de formation, et définir des méthodologies appliquées à l'identification et la quantification. Jusqu'à présent, plus de 600 DBPs ont été identifiés dans l'eau potable (Richardson et al. 2007).

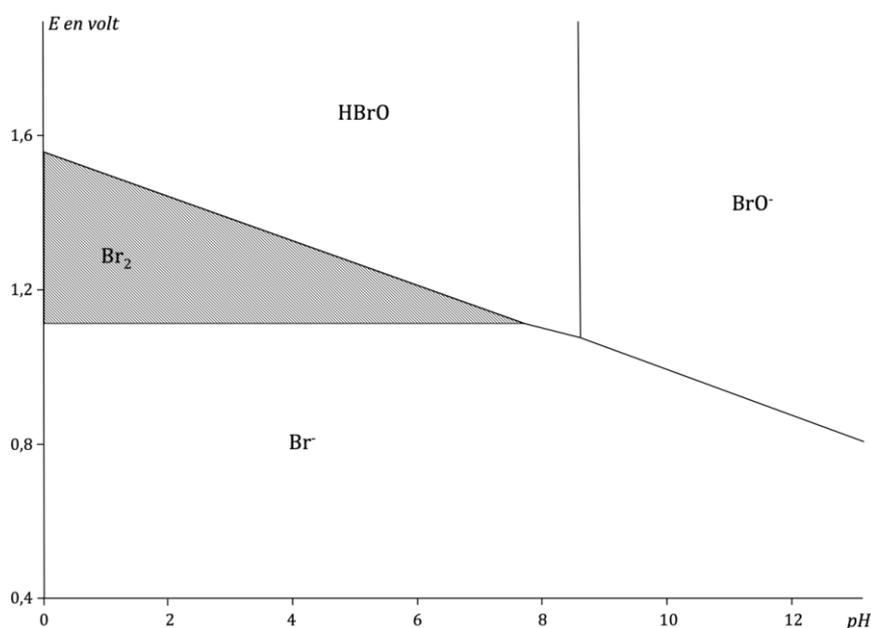


Figure 1 : Diagramme potentiel-pH du brome

La chimie des oxydants dans l'eau de mer est largement contrôlée par la forte teneur en ions halogénures (Cl⁻ : 19 g/L, Br⁻ : 65 mg/L, I⁻ : 0,05 mg/L). Le bromure est de loin le principal partenaire de réaction pour les oxydants, en raison de sa constante de vitesse

du second ordre pour ses réactions avec les oxydants chimiques de l'ordre de $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Lors de la désinfection de l'eau de mer par l'hypochlorite de sodium, le bromure est oxydé en en acide hypobromeux/hypobromite (HOBr/OBr^-) comme on peut le voir sur la Figure 1 (Von Gunten et al. 1996).

Selon Von Gunten et al. (1996), même si différents oxydants primaires peuvent être utilisés, dans les eaux salines, le principal oxydant actif est l'acide hypobromeux HOBr (Figure 1). L'occurrence et l'impact des DBPs sont très peu étudiés dans le milieu marin.

Le Laboratoire Chimie de l'Environnement (LCE) de l'université de Marseille et l'Institut Ecocitoyen de Fos sont à l'origine du projet FOSSEA, visant à étudier l'occurrence, l'impact et le devenir des rejets chlorés dans le golfe de Fos, financé par l'agence nationale de recherche (ANR). Cette thèse qui représente une partie de ce projet, s'articule de la manière suivante, le chapitre 1, sera une synthèse bibliographique des connaissances sur les sous-produits de chloration notamment dans l'environnement. Dans le chapitre 2, nous aborderons la diversité et la concentration de ces composés dans le golfe de Fos. L'impact de cette pollution sur la faune du golfe fera l'objet du chapitre 3. Et enfin pour clôturer cette thèse, dans le chapitre 4 nous avons commencé à caractériser la résistance des oursins du golfe. Le schéma suivi pour tenter de caractériser le stress infligé par les sous-produits est imagé par la Figure 2.

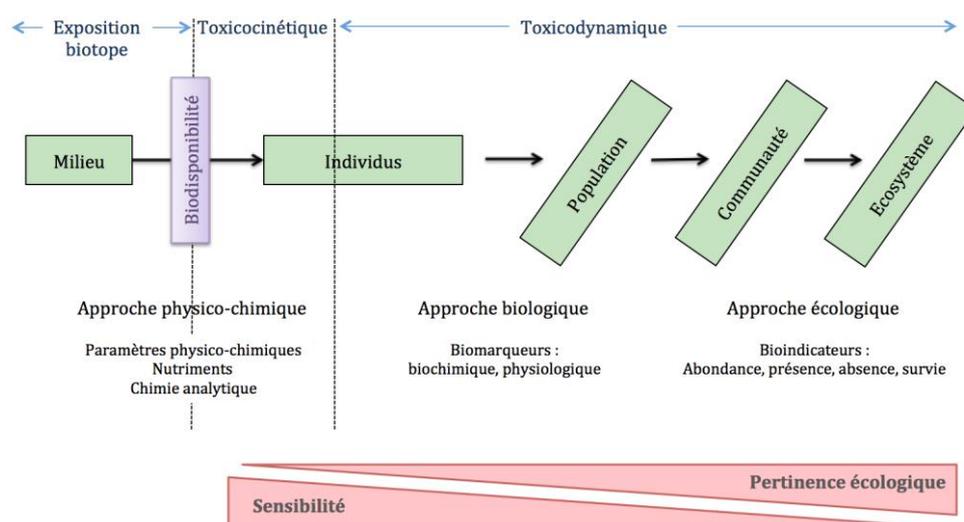


Figure 2 : Plan d'attaque pour caractériser le stress

CHAPITRE 1 : Synthèse bibliographique - Les sous-produits de chloration dans le monde

La désinfection des eaux au chlore est une pratique courante et ancienne, qui s'est progressivement accompagnée, depuis les années 1970 et les premières publications de Bellar et al. (1974); et Rook et al. (1974), d'une meilleure connaissance de la chimie du chlore en solution, de la nature des sous-produits et des conséquences pour la santé publique. Ce chapitre dresse un portrait des sous-produits de chloration. J'y aborderai leurs multiples sources, les niveaux retrouvés dans l'environnement, leur toxicité connue et la réglementation existante.

1. Source, nature et niveau des contaminations aux DBPs

1.1. Différentes sources possibles

Les organismes marins sont capables de produire des DBPs via leur métabolisme, et ainsi contribuer à leur présence dans l'environnement.

1.1.1. La production dite « naturelle » par les organismes marins

La plupart des composés naturels identifiés sont des molécules aromatiques complexes et uniques à certains organismes, donc peu répandus dans l'environnement (Gribble 2010). Certaines de ces structures sont analogues à des composés anthropiques et même des phénols bromés complexes, des dioxines et des dibenzofurannes peuvent se former naturellement. Plusieurs bromophénols, qui se forment également pendant la désinfection de l'eau de mer, ont été trouvés en quantité massive dans les vers de maïs et dans de nombreuses algues (Whitfield et al. 1999; Reineke et al. 2006). Les précurseurs des composés phénoliques chlorés, bromés et iodés peuvent également être des substances humiques complexes. Les macroalgues benthiques brunes, vertes et rouges et les microalgues pélagiques sont dotées d'une enzyme, la bromoperoxydase qui leur permet de produire et libérer des composés organohalogénés en présence de bromure et de peroxyde d'hydrogène (Neidleman and Geigert 1986; Moore et al. 1996; Whitfield et al. 1999). Dans le milieu marin riche en bromures, le peroxyde d'hydrogène est le facteur limitant leur formation. Ce dernier peut être toxique pour les cellules d'algues, ainsi la formation d'halométabolites peut être une réponse au stress oxydatif (Pedersen et al. 1996). Certains auteurs ont lié la survie de certaines algues à la présence d'halométabolites, utilisés comme moyens de défense contre les infections bactériennes et fongiques (Reichelt and Borowitzka 1984; Hornsey and Hide 1985), et comme moyen de dissuasion des brouteurs (Moore et al. 1996; Gibson et al. 2008). Deux cents composés organohalogénés différents ont également été identifiés dans une espèce de cyanobactéries (McConnell and Fenical 1977; Cabrita et al. 2010). Alors que les microalgues produisent essentiellement un mélange d'halométhanes, dont les proportions varient d'une étude à l'autre, le tribromométhane (bromoforme) est toujours le composé dominant (Quack et al. 2004). De plus, le bromoforme est le produit de dégradation le plus abondant de molécules plus complexes (Gribble 2010; Paul and Pohnert 2011; Manasfi 2016). En général, les espèces des régions polaires produisent le moins de composés bromés, alors que les espèces subtropicales et tropicales semblent

être des producteurs plus efficaces (Quack and Wallace 2003). On estime que les macroalgues produisent 220 000 tonnes de bromoforme par an, les algues brunes produisant 60 % de cette quantité (Carpenter and Liss 2000; Yokouchi et al. 2005; Warwick et al. 2006; Butler et al. 2007; Palmer and Reason 2009; Liang et al. 2010; Stemmler et al. 2015).

Une autre source naturelle de composés organohalogénés dans le milieu marin résulte de réactions photochimiques (induites par les radiations solaires) qui se produisent dans la zone euphotique, sur des composés tel que le phénol, et qui conduisent à la formation de nombreux sous-produits, dont des composés chlorés et bromés (Calza et al. 2005, 2008).

Ces substances sont souvent biologiquement actives et possèdent des propriétés antifongiques, antimicrobiennes et antioxydantes (Ochi et al. 1998; Ovenden and Capon 1999). Ces derniers aspects, ainsi que leur tendance à s'accumuler dans les sédiments et le biote marins justifient leur classification comme polluants environnementaux potentiels.

1.1.2. Les sources anthropiques des sous-produits de chloration dans le milieu marin

Les sources de DBPs retrouvés dans le milieu marin ont des origines anthropiques multiples. Elles sont pour l'essentiel associées à des procédés industriels impliquant des échanges thermiques (industries sidérurgiques, pétrochimiques, nucléaires, terminaux méthaniers, etc.), le dessalage de l'eau de mer ou encore la désinfection des eaux de ballasts. Les industries sont souvent regroupées sur une même zone d'activités et de ce fait engendrent un contexte de multi-pollutions.

- Le long de la côte où les ressources en eau sont considérées illimitées, et où 23% des centrales électriques sont situées, des milliards de m³ d'eau de mer sont utilisés, principalement pour le refroidissement des **centrales électriques et le dessalement**.

La demande en eau de refroidissement dépend du type de centrale, de la puissance et de la situation géographique. Les grandes centrales électriques sont situées dans des zones très peuplées et dans de grandes zones industrielles. C'est en Europe, en Amérique du Nord et en Asie du Sud-Est que l'on retrouve les plus grands volumes d'eau de mer traitée et de DBPs rejetés dans l'environnement (Figure 3). Les eaux de surface chaudes des tropiques sont elles aussi susceptibles d'être utilisées dans les systèmes de

refroidissement à passage unique. C'est au niveau de l'équateur que les demandes en eau sont les plus fortes et les usines de dessalement les plus utilisées.

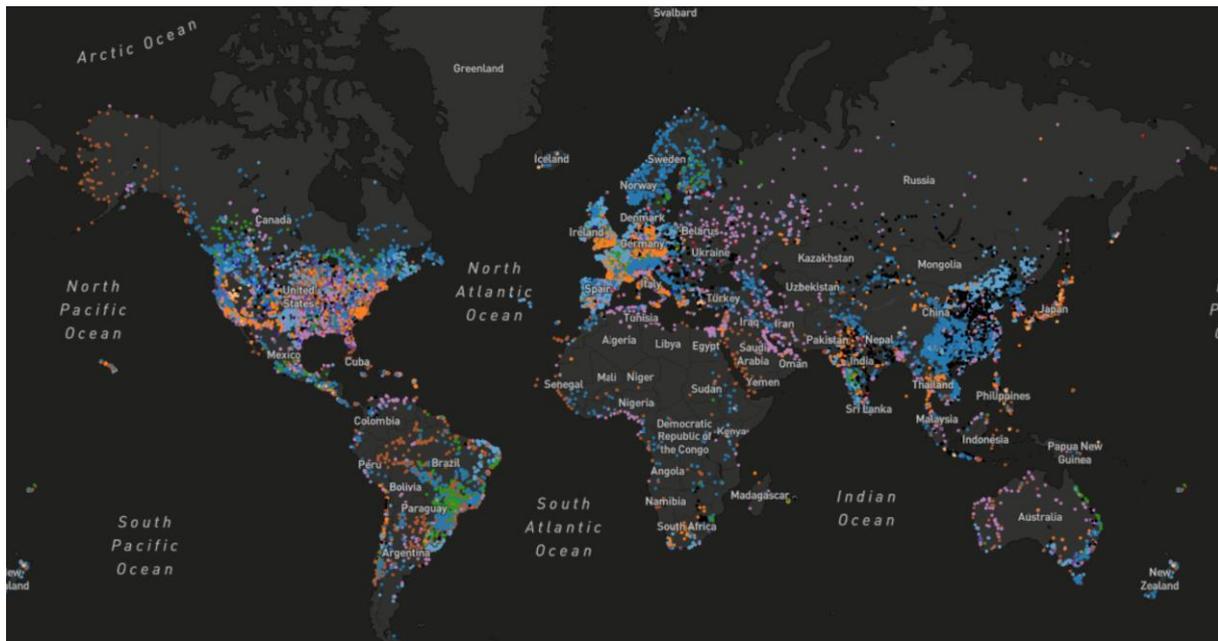


Figure 3 : Cartographie des centrales électriques dans le monde
(<https://resourcewatch.org>)

La croissance démographique rapide et les fréquentes sécheresses ont accéléré la demande en eau douce dans le monde. Depuis des décennies, les opérations de dessalement ont lieu dans de nombreux pays du Moyen-Orient, du bassin méditerranéen et d'Amérique du Sud, ainsi qu'en Australie, au Japon et aux États-Unis afin de fournir de l'eau potable à leur population. La capacité mondiale de production d'eau par dessalement a été estimée à environ 100 millions de m³/j en 2015 (Latteman 2010) mais la capacité et la production devraient encore augmenter (Hanasaki et al. 2016). Le plus grand nombre d'usines de dessalement se trouve dans le golfe Persique. Environ 60% de la capacité mondiale de dessalement traite l'eau de mer ; le reste traite l'eau saumâtre (21%) et l'eau moins salée (Bennett 2013). Le procédé de traitement peut reposer soit sur le dessalement thermique, soit sur des techniques de dessalement à membrane (osmose inverse, par exemple). Au total, les techniques d'osmose inverse et de distillation représentent respectivement 63% et 31% de la capacité mondiale de traitement (Gude 2016). D'autres industries utilisent l'eau de mer comme échangeur thermique pour réchauffer ou refroidir leurs conduites en fonction de leurs applications.

Le développement excessif de macro- et micro-fouling tels que les biofilms sur les membranes d'osmose inverse des usines de dessalement ou dans les conduites

industrielles entraîne une réduction du rendement d'échange thermique et une augmentation de la corrosion (Jenner et al. 1997). Pour prévenir l'encrassement biologique, de nombreuses techniques ont été mises au point (Jenner et al. 1998). Les systèmes de nettoyage mécanique des tubes de condenseur réduisent la croissance des biofilms. L'utilisation de peintures et de revêtements toxiques ou non toxiques réduit la fixation des macro-encrassements. Des traitements physiques (UV) ou chimiques à base de composés toxiques ont été appliqués à certains systèmes de refroidissement marins. Tous ces procédés n'ont pas éliminé l'utilisation de produits oxydants, particulièrement l'utilisation de la chloration. En raison de sa technologie éprouvée, de ses utilisations industrielles à long terme dans le monde entier et de son coût raisonnable, le chlore reste le traitement antifouling le plus courant dans les systèmes de dessalement et d'eau de refroidissement industriels (Rajagopal et al. 2012) (Figure 4). L'avantage de la chloration est aussi la disparition rapide des oxydants responsables de la toxicité aiguë dans les panaches de rejets d'eau chlorée. Cependant, les réactions chimiques des oxydants avec les matières organiques présentes dans l'eau de mer et les biofilms entraînent la formation de sous-produits essentiellement non oxydants mais persistants.

Pour contrôler efficacement la formation du biofouling, le procédé de chloration à faible niveau nécessite de maintenir une concentration résiduelle d'oxydant équivalente à environ 0,2 mg/l (exprimée en Cl₂) (Khalanski and Jenner 2012). La dose de chlore appliquée dépend de la demande en oxydant de l'eau et des circuits, elle est de l'ordre de 0,5-1,5 mg/l. En général, la croissance des biofilms est plus prononcée dans les eaux chaudes, alors qu'en hiver, lorsque le taux de croissance est extrêmement faible, un traitement oxydant n'est pas nécessaire (Newsome et al. 2011). Dans les centrales côtières françaises, la chloration est appliquée tant que la température de l'eau dépasse 10°C (Hartmann et al. 2011).

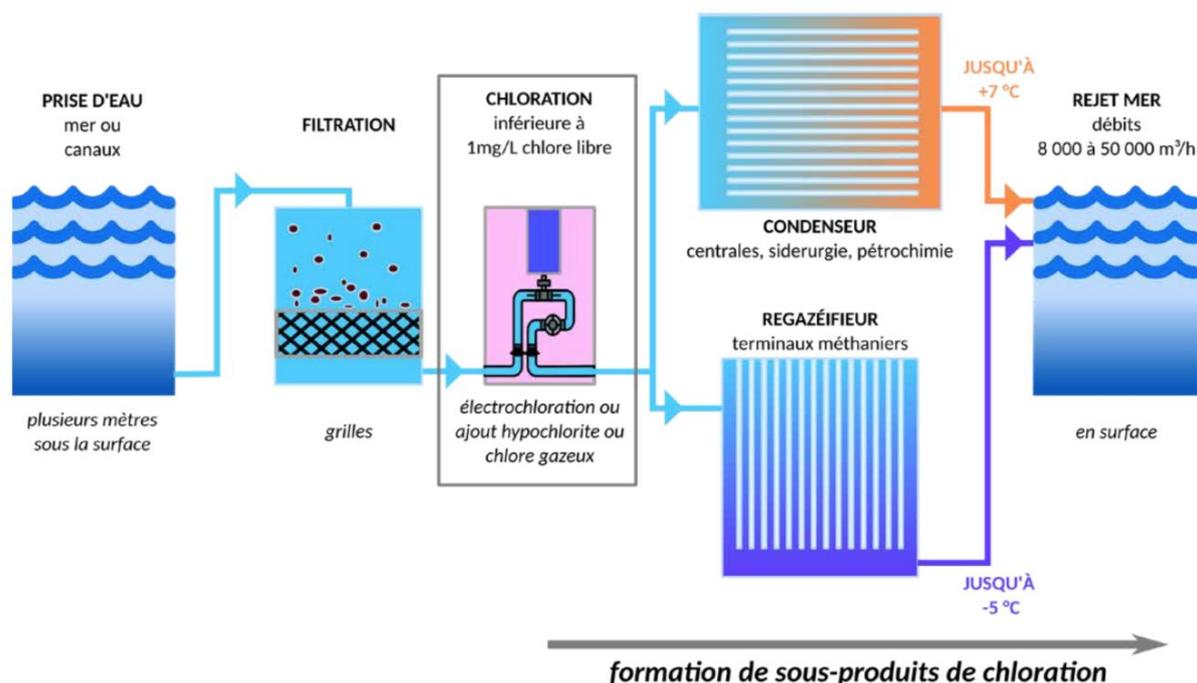


Figure 4: Principe de chloration dans les échangeurs thermiques industriels

Le volume total d'eau utilisé pour le dessalement des eaux est estimé à 200 milliards de m³ par an, soit environ le dixième des volumes utilisés pour le refroidissement (Kim et al. 2015).

Bien que la chloration soit utilisée dans le monde entier, seules quelques études sur la production de DBPs lors de la chloration de l'eau de mer sont disponibles. L'étude la plus complète sur les DBPs dans des rejets d'eau de refroidissement des centrales électriques a été publiée par Jenner et al. (1997) ; ils couvrent 90 analyses d'eaux de refroidissement dans 10 centrales électriques côtières différentes au Royaume-Uni, en France et aux Pays-Bas. Depuis, des données supplémentaires sur cette étude ont été présentées par Taylor (2006), et mettent en évidence le pouvoir bioaccumulatif du bromoforme dans le foie de poissons comme le bar, mais aucun effet indésirable notable malgré des débits d'eau de refroidissement moyen de 50m³/s et un delta de température de + ou - 10°C. Des analyses complémentaires ont été réalisées sur les centrales françaises par Allonier et al. (1999) et ont montré une pollution en DBPs de l'ordre du µg/L, pour une concentration initiale en oxydant de l'ordre de 1 mg/L. De plus, des études sur les eaux de refroidissement d'une centrale coréenne et d'une centrale indienne ont été publiées (Yang 2001; Padhi et al. 2012) ainsi que des études sur les rejets de terminaux méthaniers en France (Boudjellaba et al. 2016; Manasfi et al.

2018). Ces dernières études ont montré que le bromoforme est le sous-produit de chloration le plus abondant et ont trouvé les mêmes ordres de grandeurs en DBPs que Allonier et al. (1999).

Une empreinte environnementale des DBPs provenant de l'eau de refroidissement en Europe est clairement visible (Jenner et al. 1997; Boudjellaba et al. 2016; Manasfi et al. 2018). Tous les secteurs industriels ne cessent de prendre de l'ampleur avec l'augmentation de la demande due à la croissance économique et démographique.

- Les **eaux de ballast** sont utilisées par les navires pour se stabiliser. Cependant afin d'éviter toutes catastrophes écologiques, économiques et sanitaires, liées au transport d'espèces endémiques d'un endroit à un autre, ces eaux sont désinfectées.

Les effets des invasions d'espèces dans de nombreuses régions du monde ont été dévastateurs et causent d'énormes dommages à la biodiversité et aux ressources. Les données quantitatives montrent que le taux de bio-invasions continue d'augmenter à un rythme alarmant et que de nouvelles zones sont constamment envahies (OMI, 2018). Les dommages causés à l'environnement sont généralement irréversibles, l'organisation maritime internationale (OMI) estime à 7000 le nombre d'espèces différentes transportées chaque jour dans le monde (OMI 2018). Comme le commerce et le volume du trafic n'ont cessé d'augmenter au cours des dernières décennies, le problème n'a peut-être pas encore atteint son apogée. A l'échelle mondiale, cela représente dix milliards de m³ d'eau qui se déplacent d'un continent à l'autre. Pour la France seule, c'est un volume de 22 millions de m³ (Chauveau 2017).

Pour faire face à la propagation des espèces invasives provoquée par les eaux de ballast des navires, l'OMI a adopté en 2004 la Convention Internationale pour le Contrôle et la Gestion des Eaux de Ballast et Sédiments des navires (Convention BWM), entrée en vigueur le 8 septembre 2017. Les 52 états ayant adhéré à la convention représentent 35% du tonnage brut de la flotte mondiale des navires de commerce. La Convention exige que tous les navires en trafic international appliquent des procédures de gestion des eaux de ballast afin d'atteindre une norme de rejet qui peut impliquer l'installation de systèmes de traitement des eaux de ballast. Les microorganismes réglementés sont par exemple *Escherichia coli* (< 250 unités/100mL) ou les entérocoques intestinaux

(<100 unités/100mL). Le plancton dont la taille est comprise entre 10 et 50 µm est limité à moins de 10 organismes viables/mL (OMI 2019).

- La désinfection des **eaux usées** avant leur rejet dans l'environnement est réalisée pour préserver la salubrité du milieu côtier, tout particulièrement dans les zones récréatives ou d'aquacultures (Abarnou and Miossec 1992; Krasner et al. 2009).

Pour se conformer à la directive 91/271/CE relative au traitement des eaux urbaines résiduaires, à la directive-cadre relative à la stratégie pour le milieu marin, à la directive 79/923/CEE relative aux mollusques et crustacés et à la directive 2006/7/CE relative aux eaux de baignade, les États membres européens ont recommandé des traitements appropriés pour prévenir la propagation des micro-organismes pathogènes provenant des effluents d'eaux usées dans les milieux aquatiques (Monarca et al. 2000). Le choix des traitements est laissé aux autorités compétentes de chaque État membre. La désinfection, en tant que traitement quaternaire, est largement utilisée dans le monde, et en Europe. Dans un rapport international de Jacangelo and Trussell (2002), les modes de désinfection les plus utilisés pour le traitement des eaux usées ont été identifiés à partir de données provenant de 22 pays : il s'agit du chlore gazeux, des rayonnements UV, de l'hypochlorite de sodium, de l'ozone et des membranes. Dans les 22 pays, on retrouve 16 pays européens, 4 pays asiatiques, les États Unis et l'Afrique du sud.

1.2. Nature et niveaux des concentrations environnementales

Les données disponibles sur les occurrences de DBPs sont très limitées et propres à chaque procédé. Environ 600 espèces de DBPs ont été identifiées appartenant à différentes classes de molécules, parmi lesquelles les trihalométhanes (THM) et les acides haloacétiques (HAA) représentent environ 50% des composés organohalogénés totaux (TOX). Une grande fraction des DBPs reste cependant encore inconnue (Heller-Grossman et al. 2001).

1.2.1. Milieux aquatiques

Quatre grands groupes de DBPs ont été identifiés en termes de fréquence et de quantité de détection dans les milieux aquatiques (Manasfi et al. 2018). Leurs propriétés physico-chimiques sont résumées dans le Tableau 1.

- Les trihalométhanes (THM) incluant le chloroforme (CHCl₃), le bromodichlorométhane (CHBrCl₂), le chlorodibromométhane (CHBr₂Cl) et le bromoforme (CHBr₃). Ce sont les DBPs les plus volatils (constante de Henry > 10⁻⁴). Les THM représentent 46 à 65 % du total des DBPs (identifiés à ce jour) et le bromoforme 95% des THMs.
- Les acides haloacétiques (HAA) incluant l'acide monobromoacétique (BrCH₂COOH), l'acide dibromoacétique (Br₂CHCOOH) et l'acide tribromoacétique (Br₃CCOOH). Ils sont en partie formés par hydrolyse d'haloacétonitriles et sont non volatils. L'acide di- et tri-bromoacétique représentent 25% à 45% respectivement de la pollution en DBPs.
- Les haloacétonitriles (HAN) sont formés par oxydation des acides aminés. Ils sont semi-volatils et les plus hydrophiles. Le dibromoacétonitrile (Br₂CHCN) est le plus communément trouvé et occupe la troisième place avec 6% à 9% du total.
- Les halophénols (HP) incluant le 2,4,6 tribromophénol (C₆H₃Br₃O) qui est le plus communément rencontré, bien que le dibromophénol soit parfois signalé. Ils ne sont pas volatils. Le 2-4-6 tribromophénol demeure inférieur à 1 %, mais en raison de son Log Kow élevé (4.13) et sa faible solubilité, c'est le composé a priori le plus bioaccumulable (Almqvist 2011; Covaci et al. 2011).

Les concentrations environnementales dépendent essentiellement de la concentration en principe désinfectant ajouté et de la qualité du milieu, mais elles sont en moyenne de l'ordre du microgramme par litre avec des valeurs hautes pouvant atteindre 150 µg/L, rapportées pour le bromoforme en Corée par Yang (2001).

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de quelques représentants des principales familles de DBPs

Substances	Structure	N°CAS	log P (octanol-eau) <i>logKow</i>	Solubilité dans l'eau (g/L) à 25°C	Constante de Henry (atm.m ³ /mole) à 25°C
Trihalométhane					
Bromoforme		75-25-2	2,4	3,1	5,35E-04
Chlorodibromomethane		124-48-1	2,16	2,7	7,83E-04
Acide haloacétique					
Acide bromoacétique		79-08-3	0,41	93,8	6,31E-08
Acide tribromoacétique		75-96-7	1,7	200	3,30E-09
Haloacétonitrile					
Dibromoacétonitrile		3252-43-5	0,47	9600	4,06E-07
Halophénol					
2,4,6 tribromophénol		118-79-6	4,13	0,06	4,70E-08

1.2.2. Réseau trophique

Les travaux qui ont permis de déterminer les concentrations en DBPs dans le réseau trophique sont très limités. A ma connaissance, uniquement des études portant sur les halophénols (HP) existent (Whitfield et al. 1998; Chung et al. 2003; Nomiya et al. 2011; Boudjellaba et al. 2016). Ces composés sont responsables d'un parfum « océanique » qui rehausse l'intensité de la saveur existante des fruits de mer, à des concentrations appropriées (Boyle et al. 1992, 2006). Ces études ont mesuré la concentration en halophénols, dans différents poissons des côtes australiennes (Whitfield et al. 1998), dans les produits de la mer d'Asie destinés à la consommation humaine tels que les huîtres, les coques, les crevettes, les crabes (Chung et al. 2003). Nomiya et al. (2011) ont déterminé la dose d'HP dans les cétacés des côtes japonaises. Et enfin en 2016, Boudjellaba et al. ont étudié les congres d'un golfe industrialisé des côtes Françaises, le golfe de Fos. Dans toutes ces publications les teneurs en 2,4,6 tribromophénol sont de l'ordre du ng/g de matière sèche. Comme nous l'avons vu plus haut, les phénols sont aussi naturellement produits par certains organismes marins et notamment les algues (Adb el baky et al. 2009; Xu et al. 2009; Liu et al. 2011; Freile-Pelegrin and Robledo 2014). La distribution et les variations saisonnières de la teneur en bromophénols de la faune marine coïncident avec le cycle de croissance saisonnier des algues, ce qui suggère, pour une contamination de l'ordre du ng/g, que la source principale de contamination en HP est l'alimentation (Chung et al. 2003).

2. L'actualité des DBPs

2.1. Risques associés aux DBPs en santé publique

La chloration de l'eau potable est largement répandue dans le monde pour limiter et prévenir les risques infectieux véhiculés par l'eau de consommation. Selon un rapport de l'agence régionale de santé (ARS 2017), plus de 95% de la population française était alimentée par une eau désinfectée.

En 1974, la découverte des DBPs dans les réseaux a déclenché de nombreuses études afin de caractériser les propriétés toxicologiques et épidémiologiques de ces nouveaux composés (Bellar et al. 1974; Rook et al. 1974). Un état des connaissances synthétisant la toxicité de 85 DBPs a été réalisé en 2007 par Richardson et al. (2007), et une partie

est résumée dans le Tableau 2. La majorité des composés présentés est génotoxique et peut favoriser la formation de cancers. Les nombreux travaux qui ont contribué à la réalisation de ce tableau, ont tous montré une toxicité supérieure des composés bromés par rapport à leurs analogues chlorés quel que soit le modèle utilisé : rat, cellules de mammifère, microorganisme (Plewa et al. 2000, 2002, 2004, 2008; Kargalioglu et al. 2002; Kundu et al. 2004; Cemeli et al. 2006; Copete et al. 2011). En revanche, aucune information concernant la carcinogénicité n'était disponible pour les iodo-THMs et haloacétamides qui se sont révélés être plus cytotoxiques et génotoxiques que les acides haloacétiques actuellement réglementés pour l'eau potable (Richardson et al. 2010; Plewa et al. 2010).

Tableau 2 : Tableau récapitulatif réalisé par Richardson et al 2007, sur les sous-produits de chloration retrouvés dans les eaux destinées à la consommation humaine et leur toxicité associée.

DBPs	Occurrence	Génotoxicité	Carcinogénicité
DBPs réglementés			
<i>Trihalométhanes THMs</i>			
Chloroforme	*****	-	+
Bromodichlorométhane	****	+	+
Chlorodibromométhane	****	+	+
Bromoforme	****	+	+
<i>Acides haloacétiques HAAs</i>			
Acide Chloroacétique	***	+	-
Acide Bromoacétique	***	+	
Acide Dichloroacétique	*****	+	+
Acide Dibromoacétique	*****	+	+
Acide Trichloroacétique	*****	-	+
DBPs non réglementés			
<i>Halonitrométhanés</i>			
Chloronitrométhane	**	+	
Bromonitrométhane	**	+	
Dichloronitrométhane	**	+	
Dibromonitrométhane	***	+	
Bromochloronitrométhane	**	+	
Trichloronitrométhane	****	+	
Bromodichloronitrométhane	***	+	
Dibromochloronitrométhane	***	+	
Tribromonitrométhane	***	+	

<i>HAAs</i>		
Bromochloroacétique	*****	+
Acide Bromodichloroacétique	*****	+
Acide Dibromochloroacétique	*****	+ +
Acide Tribromoacétique	*****	
<i>Iodo-THMs et autres THMs</i>		
Dichloriodométhane	***	
Bromochloriodométhane	***	
Dibromiodométhane	***	
Chlorodiodométhane	***	
Bromodiodométhane	***	
Iodoforme	***	+
Dichlorométhane	***	+
Bromochlorométhane	ND	+
Dibromométhane	ND/**	+
<i>Haloacétamides HAAs</i>		
Chloroacetamide	***	+
Bromoacetamide	***	+
Iodoacetamide		+
Dichloroacetamide	***	+
Bromochloroacetamide	***	+
Dibromoacetamide	***	+
Bromoiodoacetamide	***	+
Trichloroacetamide	***	+
Bromodichloroacetamide	***	+
Dibromochloroacetamide	***	+
Tribromoacetamide	***	+
Diiodoacetamide		+
Chloroiodoacetamide		+
<i>Haloacétonitriles HANs</i>		
Chloroacétonitrile	***	+
Bromoacétonitrile	***	+
Iodoacétonitrile		+
Dichloroacétonitrile	***	+
Bromochloroacétonitrile	***	+
Dibromoacétonitrile	***	+
Trichloroacétonitrile	***	+
Bromodichloroacétonitrile	***	
Dibromochloroacétonitrile	***	
Tribromoacétonitrile	***	

ND : non détecté ; * : niveau très faible ng/L; ** : niveau intermédiaire ng/L – µg/L;
 *** : niveau faible µg/L; **** : niveau intermédiaire µg/L; ***** : niveau modéré µg/L;
 ***** : niveau élevé µg/L.

Les halophénols ont fait l'objet de différentes études de toxicité puisqu'on les retrouve notamment dans le vin rouge. Copete et al. (2011) ont montré un effet cytotoxique des chlorophénols. Selon l'organisation mondiale de la santé, le 2,4,6 trichlorophénol est classé par l'IARC possible cancérigène pour l'homme (2B), puisque des études ont mis en évidence des cas de leucémie, et chez la souris des cancers du foie (WHO 1996).

2.2. La réglementation sanitaire des DBPs

Aujourd'hui, les réglementations des DBPs ne concernent que l'eau potable et se durcissent peu à peu. La première réglementation a vu le jour au Canada en 1978 et limitait la concentration totale en THMs à 350 µg/L. Puis, en 1996, la limite a été abaissée à 100 µg/L, pour s'établir à 80 µg/L en 2006 (Costet-Deiber). Enfin, en 2008, des recommandations concernant spécifiquement les HAAs imposent que la somme des 5 principaux composés ne dépasse pas 80 µg/L (Santé Canada). En France, la réglementation du Code de la santé publique, datant de 2003, ne considère que les THMs totaux, limités à 100 µg/L. Alors que les réglementations se durcissent dans les pays industrialisés (EU, Canada, Asie), on observe cependant une augmentation constante des THMs dans les réseaux d'eau potable d'un facteur 2 à 6, liée à une sur-chloration des réseaux (Mouly et al. 2009).

A l'échelle mondiale, en 1993, l'OMS a établi des valeurs guides pour certains THM et HAA. Les valeurs les plus restrictives concernent le bromodichlorométhane et l'acide dichloroacétique, 60 µg/L et 50 µg/L respectivement. Le chloroforme est limité à 200 µg/L, alors que le dibromochlorométhane et l'acide trichloroacétique sont limités à 100 µg/L.

2.3. Réglementation environnementale

Sur la base de l'évaluation des risques réalisée par le Ballast Water Working Group (BWWG), une limite a été fixée pour les résidus totaux oxydés (TRO) à 0,1 mg Cl₂/L dans les eaux de ballast rejetées considérées comme « ne présentant aucun risque inacceptable pour l'environnement » (GESAMP-BWWG 2018). Concernant les eaux de refroidissement, la concentration en chlore libre injectée dans les conduites se situe généralement autour de 0,5 mg/L. La valeur de la concentration maximale autorisée en principe actif est établie par les autorités locales (arrêté préfectoral).

Pourtant, malgré leur toxicité croissante avérée sur la plupart des systèmes biologiques étudiés, et les pratiques actuelles visant à rejeter des eaux chlorées dans l'environnement, très peu d'études ont porté sur l'impact des sous-produits bromés sur l'environnement : faune, flore en milieu aquatique d'eau douce ou marin (Teixidó et al. 2015). Ainsi, il n'existe aucune norme environnementale concernant les sous-produits de chloration.

Dans toutes les applications environnementales, la législation tend à s'améliorer et à se durcir en limitant la concentration en principe actif à la source. En revanche, aucune recommandation n'existe pour les sous-produits. Or, dans l'environnement, 100% du désinfectant est transformé très rapidement (i.e. quelques secondes) en composés non réglementés. C'est bien là qu'est le paradoxe de la pollution chlorée (INERIS 2001).

3. Évaluation de la toxicité et des perturbations induites par les DBPs dans l'environnement

3.1. Les biomarqueurs

L'utilisation croissante de la chloration soulève des questions sur l'impact direct ou indirect des sous-produits sur les organismes vivants. Une façon de mettre en évidence un impact significatif d'une substance sur un organisme vivant est de suivre un biomarqueur. Depledge et al. (1995) définissent un biomarqueur comme un changement biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui peut être mesuré dans différents compartiments de l'organisme, mettant en évidence l'exposition et/ou les effets d'un ou plusieurs xénobiotiques. Van der Oost et al. (2003) en distinguent trois catégories :

- Les biomarqueurs d'exposition : ce sont des indicateurs de la présence d'un polluant dans les systèmes biologiques.
- Les biomarqueurs d'effet : ils témoignent de modifications biochimiques, physiologiques, comportementales établies au sein d'un organisme dont les réponses peuvent être associées à un trouble ou à une anomalie. Dans cette catégorie on retrouve par exemple les malformations, les mesures de l'intégrité de la structure de l'ADN (cassures, liaisons), les espèces réactives de l'oxygène, les mécanismes de défenses telles que les enzymes antioxydantes et les réactions de peroxydation lipidique.

- Les biomarqueurs de susceptibilité : ils indiquent une capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre à un stress, par exemple l'exposition à un xénobiotique spécifique, qui est héritable.

Les biomarqueurs sont ainsi des outils qui permettent de détecter, idéalement de façon précoce et spécifique, la nature et l'intensité d'une perturbation du milieu, par exemple une pollution chimique, impactante pour le vivant local.

L'idée sous-jacente est donc d'analyser des variations naturelles d'abondances et/ou d'occurrence de biomarqueurs pertinents afin d'anticiper les effets néfastes et potentiellement irréversibles des xénobiotiques. Un bon biomarqueur est sensible, fiable, permet une analyse rapide et à moindre coût (Perrichon 2014).

En outre, de nombreux biomarqueurs sont considérés dans des bio-essais pour caractériser, dans des conditions contrôlées, la toxicité d'une substance sur un modèle biologique choisi. Ces tests permettent de déterminer les concentrations induisant ou non un effet, comme les concentrations effectives 10-50 et 90 % ou les concentrations n'induisant pas d'effet ou le premier effet (respectivement NOEC et LOEC), sur une durée d'exposition donnée. Ces essais sont classés selon le type d'exposition, aiguë ou chronique, et selon les observations souhaitées.

3.1.1. Les variations phénotypiques

L'impact d'un stress peut s'évaluer directement par observation visuelle, en analysant généralement le développement larvaire. En effet, les mesures classiquement réalisées concernent la survie, les anomalies de développement, les retards de croissances et tous types de différences phénotypiques observables ; elles sont simples à réaliser, nécessitent peu de moyen et sont peu coûteuses. C'est ainsi un outil pertinent pour les études de biomonitoring (Carballeira et al. 2012; Gharred et al. 2016).

3.1.2. Les variations biochimiques

La vie cellulaire repose sur le maintien de l'homéostasie (i.e. le maintien des équilibres physiologiques normaux). Lorsque qu'une cellule subit un stress, des systèmes biochimiques sont mis en place afin de maintenir et/ou rétablir l'homéostasie. Au cours de l'évolution, de nombreuses protéines ont été sélectionnées pour leur capacité à transformer et éliminer des molécules potentiellement toxiques, d'origine endogène (espèces radicalaires provenant par exemple de la respiration) ou exogène (polluants).

Une partie de l'activité cellulaire consiste donc à éliminer les substances toxiques et/ou étrangères.

L'excrétion de molécules toxiques s'opère classiquement en plusieurs phases. Les enzymes de phase I, comme les cytochromes P450, vont généralement oxyder le xénobiotique. Au cours de la phase II, les enzymes de conjugaison, telles que la glutathione-S-transférase et la UDP glucuronosyltransférases, vont modifier les xénobiotiques en transférant, sur ces xénobiotiques, des molécules polaires. Ces réactions de conjugaison augmentent ainsi l'hydrophilie de la molécule et facilitent son transport à l'extérieur de la cellule. L'abondance de ces protéines est généralement positivement corrélée avec le niveau de stress, si bien que le dosage de ces enzymes constitue un marqueur de stress.

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des molécules naturellement produites au cours de la vie cellulaire et qui ont un rôle physiologique important en tant que molécules de signalisation et régulation cellulaires (Migdal and Serres 2011). Elles ont des temps de demi-vie très courts, mais sont hautement réactives et peuvent induire de nombreux dommages cellulaires et moléculaires. Ainsi, la cellule doit maintenir l'abondance de ces ROS dans des limites physiologiques. Un arsenal d'enzymes, dites antioxydantes (catalase, superoxyde dismutase, peroxydase) permet d'assurer l'homéostasie vis-à-vis des ROS. Cependant, l'exposition à différents facteurs de stress, physiques et/ou chimiques, peut induire une sur-production de ces espèces réactives de l'oxygène, et déclencher un stress oxydant, lié à une augmentation rapide et intense du taux d'oxydation des macromolécules telles que l'ADN, les lipides et les protéines (Figure 5), et engendrer des dégâts cellulaires considérables, pouvant aboutir au vieillissement prématuré, ou à la prolifération cellulaire incontrôlée, évoluant souvent en tumeur (Lazo-de-la-Vega-Monroy and Fernandez-Mej 2013).

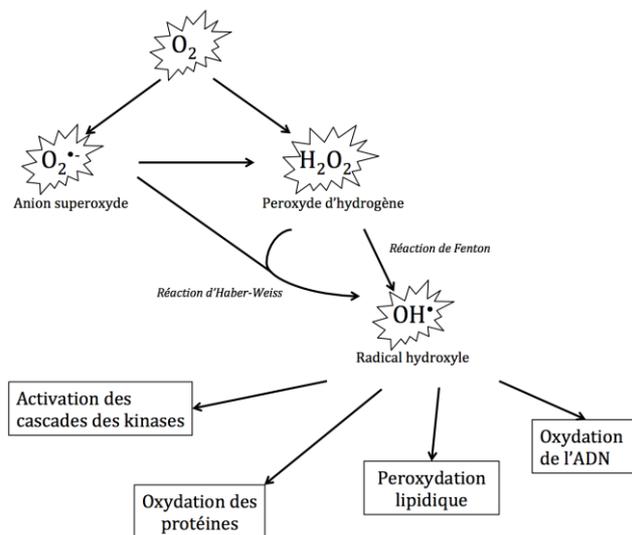


Figure 5 : Schéma des différentes formes de ROS

Il existe plusieurs biomarqueurs pour caractériser un stress oxydant, susceptible d'aboutir à un stress génotoxique, allant des dosages qui mettent en avant le déséquilibre dans le cycle de l'oxygène cellulaire, jusqu'au test des comètes qui va révéler l'abondance des lésions de l'ADN. En effet, les principales molécules affectées par les ROS sont :

- L'ADN, dont l'un ou les deux brins peuvent être lésés en plusieurs endroits de la molécule. On parlera de lésions simples ou doubles brins (SSB et DSB pour Single Strand Breaks et Double Strand Breaks, respectivement). D'autres modifications peuvent apparaître, par exemple la modification de la base purique guanine en 8-oxo-dG, dont l'excès peut provoquer l'apparition de cancers (Haleng et al. 2007).
- Les lipides membranaires, qui peuvent être peroxydés altérant leur fonctionnalité. Des défauts de régulation de la peroxydation lipidique sont associés à la senescence cellulaire (Figure 6)(Cillard and Cillard 2006).
- Les protéines, de la même façon que les lipides, peuvent aussi être oxydées par les ROS. L'excès de protéines oxydées et agrégées est délétère pour un organisme, chez l'homme il est souvent associé à des maladies dégénératives (Haleng et al. 2007).

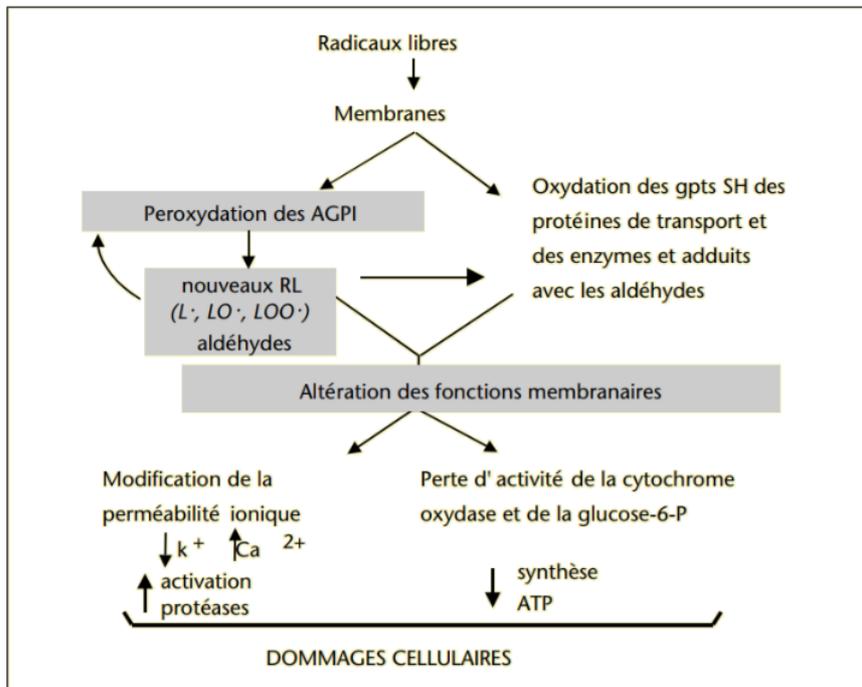


Figure 6 : Schéma des différentes étapes de la peroxydation lipidique

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 ROS. L'ampleur des dommages oxydatifs est directement liée à l'efficacité des systèmes antioxydants cellulaires. Parmi les systèmes antioxydants enzymatiques, la superoxyde dismutase (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). Le peroxyde d'hydrogène peut être à son tour éliminé par deux autres enzymes, la catalase (CAT) qui est une hémoprotéine active dans les peroxysomes et la glutathione peroxydase qui est une sélénoprotéine. Ces enzymes agissent en décomposant le H₂O₂ en H₂O et O₂.

De façon plus générale, l'évaluation des défenses anti-oxydantes constitue un biomarqueur 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 (Vasseur and Cossu-Leguille 2003).

3.1.3. Dommages de l'ADN

Le pouvoir génotoxique d'un polluant lui permet d'interagir avec l'ADN et de compromettre son intégrité. L'exposition à des composés génotoxiques peut avoir un impact sur le développement, la reproduction et la survie des individus (Hagger et al. 2005; Pereira et al. 2011; Lee et al. 2012). Cette capacité est donc importante à prendre en compte dans l'évaluation de la toxicité d'un xénobiotique, et est devenue une préoccupation majeure (Würgler and Kramers 1992; Jha 1998; Liyan et al. 2005). La détection et la quantification des altérations de l'ADN sont souvent utilisées comme biomarqueur de génotoxicité, dans des conditions d'expositions aiguës ou chroniques.

L'action génotoxique varie en fonction des polluants. Ils peuvent entraîner des lésions primaires structurales se traduisant par des adduits à l'ADN, des pontages ADN-protéines, des pontages intra- et inter-brins, des mutations dans la séquence des gènes, ou des mutations de type réarrangements génomiques (translocation, micro-noyau) (Ammar 2018).

Afin de déterminer les cassures simple/double brins de l'ADN, le test des comètes est la technique la plus répandue, de par sa rapidité, sa simplicité et sa sensibilité (Tice et al. 2000; Akcha et al. 2003; Kilemade et al. 2004; Frenzilli et al. 2009). Ce test renseigne sur l'intensité du pouvoir génotoxique d'un xénobiotique sur un système biologique d'intérêt (Devaux et al. 1997). En outre, le test des comètes permet de révéler les lésions de l'ADN caractéristiques des cellules apoptotiques (Frenzilli et al. 2009). La méthode est basée sur la migration électrophorétique au travers d'un gel d'agarose, de l'ADN endommagé à partir du noyau. Après coloration, le profil de migration prend la forme caractéristique d'une comète, dont la tête correspond au noyau de la cellule contenant de l'ADN intact, tandis que la queue de comète est formée par les brins d'ADN cassés (Figure 7).

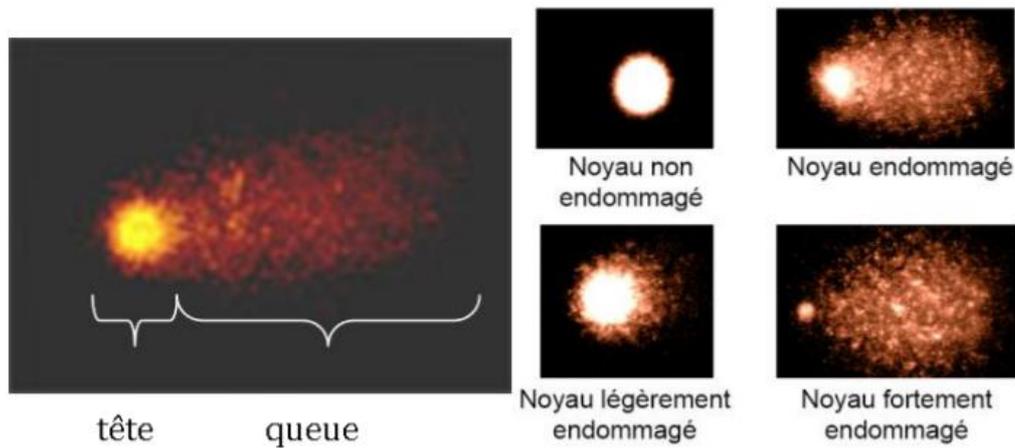


Figure 7 : Structure d'une comète

3.1.4. Expression de gènes

On désigne par le terme « expression de gènes » le processus métabolique qui consiste à exprimer la séquence ADN des gènes en protéines fonctionnelles. L'expression de gènes est finement régulée, depuis l'étape de la transcription de l'ADN en ARN jusqu'aux modifications post-traductionnelles des protéines (Figure 8).

Le profil d'expression du génome (i.e. l'expression de tous les gènes « actifs » d'une cellule) varie généralement avec les conditions environnementales, à priori dans le sens du maintien de l'homéostasie cellulaire. Le type de réponse transcriptomique peut être corrélé au type de pollution, ce qui en fait un bioindicateur pertinent couramment utilisé. La comparaison des réponses entre les populations naturelles présentes en sites pollués et non pollués (i.e. de référence) peut, de plus, être particulièrement pertinente pour détecter l'évolution récente des systèmes contaminés (Whitehead et al. 2011; Bozinovic et al. 2014).

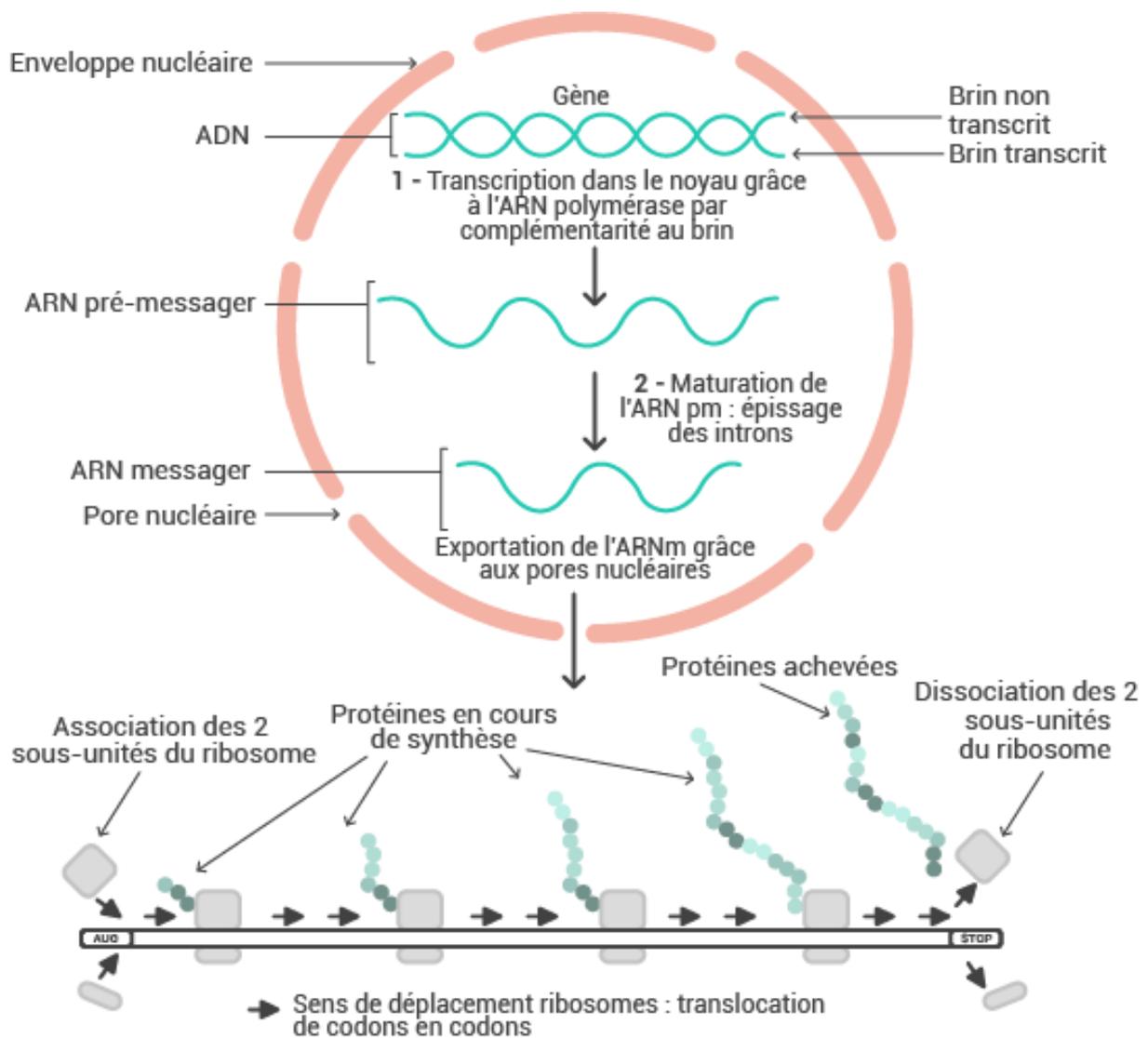


Figure 8 : Principe de l'expression génique (cas d'un gène codant pour une protéine)

3.2. Les organismes modèles

Les espèces bioindicatrices sont des organismes vivants, qui fournissent des informations sur la qualité de l'environnement, des écosystèmes marins profonds aux habitats terrestres de haute altitude (Miller et al. 2007; Holt and Miller 2010). Leur utilisation repose sur l'hypothèse que les effets cumulatifs des changements environnementaux sont qualifiables/quantifiables par l'état ou les tendances actuelles de la diversité, de l'abondance ou de l'accumulation des polluants chez une ou plusieurs espèces vivant dans cet environnement (Bartell 2006; Burger 2006; Zukal et al. 2015; Bonanno and Orlando-Bonaca 2018). Ces espèces sont des outils importants pour détecter les changements dans l'environnement et ont le potentiel d'évaluer la « santé

des écosystèmes » avant que leur fonctionnalité ne soit compromise, en fournissant des réponses biologiques qui peuvent guider les gestionnaires environnementaux (Khatri and Tyagi 2015; Bonanno and Orlando-Bonaca 2018). L'utilisation des bioindicateurs comme sentinelles de la santé de l'environnement est aujourd'hui une approche pertinente qui renseigne sur l'effet d'un milieu sur le vivant (Bonanno and Pavone 2015; Siddig et al. 2016). Tout bon bioindicateur, quelle que soit sa place dans le réseau trophique, doit posséder certaines propriétés, dont la présence naturelle, l'abondance, la facilité d'identification et d'échantillonnage, une tolérance modérée aux perturbations et aux stress, et une large distribution géographique de sorte que l'on puisse identifier plusieurs populations exposées à différentes concentrations de polluants ou de facteurs de stress (Hellowell 1986; Mathes and Pfetsch 1991; Carignan and Villard 2002).

Le milieu marin est de plus en plus exposé à des pollutions diverses et variées, qui menacent l'intégrité de nombreux habitats et du biote associé, des milieux côtiers aux milieux pélagiques et des écosystèmes benthiques aux écosystèmes de surface (Urban-Malinga et al. 2018; Nagarajan et al. 2018; Bonsignore et al. 2018). Pour des raisons écologiques et économiques, la nécessité de surveiller l'état du milieu marin s'est considérablement accrue au cours des dernières décennies (Ofiara and Seneca 2006; Ávila et al. 2018; Fox-Kemper et al. 2019). En conséquence, l'utilisation d'espèces bioindicatrices de la pollution marine est devenue une pratique établie pour évaluer les effets de divers types de polluants sur les écosystèmes marins (Rainbow 1995; Ostapczuk et al. 1997; Leal et al. 1997; Muse et al. 1999). En effet, on évalue surtout l'effet de multi-contamination en milieu naturel ou l'effet de polluants choisis en laboratoire. A ce jour, de nombreuses espèces de différents groupes taxonomiques ont été utilisées comme bioindicateurs de divers polluants marins.

Les algues, utilisées pour des bio-essais par Allen et Telson en 1919 pour la première fois, se sont révélées être un modèle pour les tests écotoxicologiques (Coillie et al. 1983). En effet, leur place de premier maillon de la chaîne alimentaire ainsi que les avantages que procure leur culture (sensibilité, petits volumes, représentativité) les rendent particulièrement intéressantes. Les tests avec des algues sont basés soit sur des mesures de croissance soit sur des mesures de paramètres biochimiques telle que la fluorescence. Yamamuro et al. (2003); Alquezar et al. (2013); Delunardo et al. (2015) ont notamment utilisé des macroalgues comme bioindicateur d'une variation en nutriments. García-Seoane et al. (2018); Bonanno and Raccuia (2018) ont, quant à eux,

utilisé les algues comme indicateur d'une pollution aux métaux lourds.

Les organismes bivalves telles que les moules et les huîtres ont fait l'objet de nombreux travaux de suivis de qualité des eaux estuariennes et littorales de part leur importance écologie et économique. Leur capacité à bioaccumuler les polluants a largement été démontrée. De plus, le développement embryonnaire est rapide et très sensible à la qualité du milieu. Les bivalves ont servi de bioindicateur pour des pollutions aux métaux lourds (Dirrigl et al. 2018), aux produits pharmaceutiques (Cunha et al. 2017) mais également à divers polluants organiques (Lüchmann et al. 2015; Viñas et al. 2018).

Les oursins sont également de bons candidats car ils jouent un rôle central dans la structuration des communautés benthiques marines, à la fois comme herbivores et comme proies (Pearse 2006). Leur fonction de brouteur benthique les expose au risque de bioamplification. De plus, le développement embryonnaire de l'oursin est devenu intéressant pour la communauté scientifique, notamment en biologie, biochimie et génétique et les plus anciennes études datent du 19^{ième} siècle (Morgan 1894; Kobayashi et al. 1972; Dinnel et al. 1987). Les larves d'échinodermes sont en effet faciles à produire en abondance et leur croissance est relativement rapide. Les oursins, tel que l'oursin violet *Paracentrotus lividus*, présentent une forte plasticité phénotypique leur permettant de s'adapter à une large gamme de conditions environnementales comme la température, l'hydrodynamisme, la qualité de l'eau ainsi que la qualité et la quantité de nourriture disponible. *P.lividus* peut supporter des températures allant de 4 °C à 30 °C, et peut survivre en milieu lagunaire à des salinités comprises entre 15 et 40 ppm (Boudouresque and Verlaque 2007). Parmi les études qui ont utilisé les oursins comme bioindicateur, on retrouve Pinsino et al. (2008); Gharred et al. (2016) et Bonaventura et al. (2018) pour une pollution métallique. Savriama et al. (2015); Amri et al. (2017) et Rocha et al. (2018) pour l'étude de pollution organique.

Les poissons, notamment de fond tels que les congres ou les anguilles, sont également utilisés pour les suivis de bioaccumulation et bioamplification. Ces espèces prédatrices situées au sommet de la pyramide écologique, sont susceptibles de concentrer des polluants par rapport aux concentrations environnementales. Caçador et al. (2012) ont étudié la pertinence d'une vingtaine de poissons comme bioindicateur d'une pollution métallique. Smalling et al. (2016) ont utilisé le poisson *Pomatomus saltatrix* comme indicateur d'une pollution organique.

Les portes d'entrée et de sortie des polluants varient selon la nature du composé et les capacités de l'organisme. Le polluant peut être stocké, excrété ou transformé. La toxicité y est directement liée. Dans l'organisme, le polluant peut se lier à d'autres molécules et ainsi interférer dans les voies métaboliques par exemple. Les organismes marins exposés de manière chronique à des environnements multi-pollués sont capables de s'adapter, d'évoluer afin de limiter leur intoxication. Nous le verrons par la suite à l'aide des biomarqueurs décrits précédemment.

4. Le site d'étude : le golfe de Fos

Sur la côte méditerranéenne française, au Nord-Ouest de Marseille se trouve l'un des plus grands ports de commerce de France ainsi qu'une zone industrielle conséquente, le golfe de Fos (Figure 9). Le pôle industriel de Fos présente la 2^{ème} concentration en sites Seveso après l'estuaire de la Seine en France. Il comprend des industries de pétrochimie, de raffinerie, des centrales thermiques à gaz naturel, des terminaux méthaniers, pétroliers et minéraliers. Ce golfe semi-fermé de 147 km² favorise le confinement de l'eau et reçoit les panaches du deuxième plus grand fleuve méditerranéen, le Rhône, entre autres apports d'eau douce (Arfi 1984; Ulses et al. 2005).

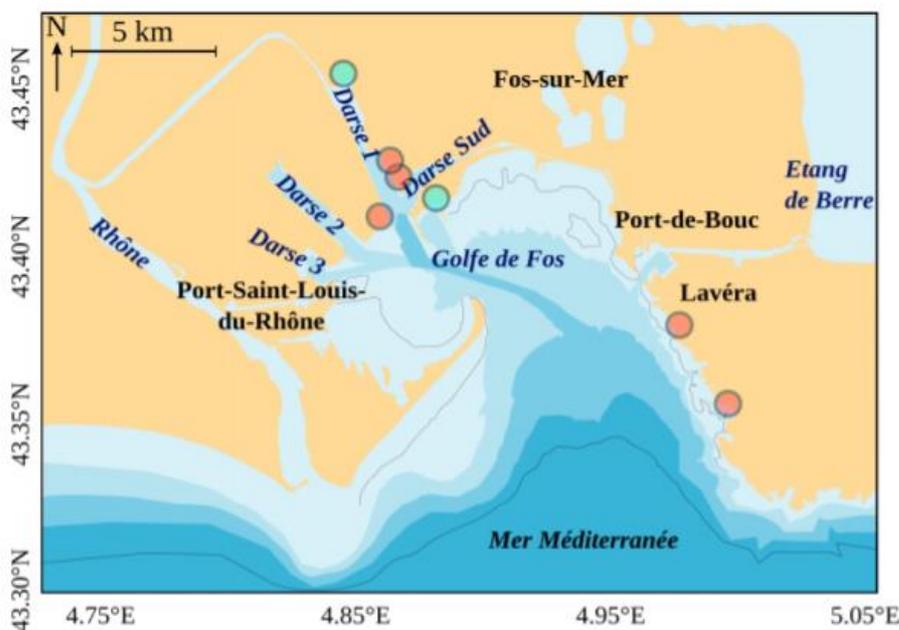


Figure 9 : Cartographie du golfe de Fos.
En vert des rejets industriels chlorés froids et en orange les rejets chauds.

Avec une telle diversité industrielle, le golfe est soumis à un panel de pollutions différentes entraînant une multi-contamination du site : métaux, hydrocarbures, et autres polluants organiques.

En effet, selon Benon et al. (1978), le golfe de Fos est une des zones les plus polluées d'Europe en éléments traces métallique (ETM) (Figure 10). Les teneurs retrouvées sont 7, 20 et 30 fois supérieures pour le Cu, Cd, et Zn respectivement que celles de Chester and Stoner (1974) pour les eaux océaniques considérées comme référence. Par ailleurs, parmi les eaux côtières étudiées de telles concentrations sont rarement retrouvées, on compte parmi les sites les plus pollués, les eaux de Hong-Kong (Chan et al. 1974), les eaux de Oslofjord (Andersen et al. 1973), la baie de Cardigan et le chenal de Bristol (Abdullah et al. 1972). Les études de Fukai and Huynh-Ngoc (1976) sur les eaux côtières et hauturières méditerranéennes ont mis en évidence le rôle exceptionnel du golfe de Fos sur la pollution aux métaux lourds. Un rapport plus récent a été réalisé à la demande du centre de traitement multi-filières de déchets ménagers de Fos en 2009, et a mis en avant une pollution au plomb conséquente dans l'eau, les sédiments et les poissons (Golder Expertise 2009).

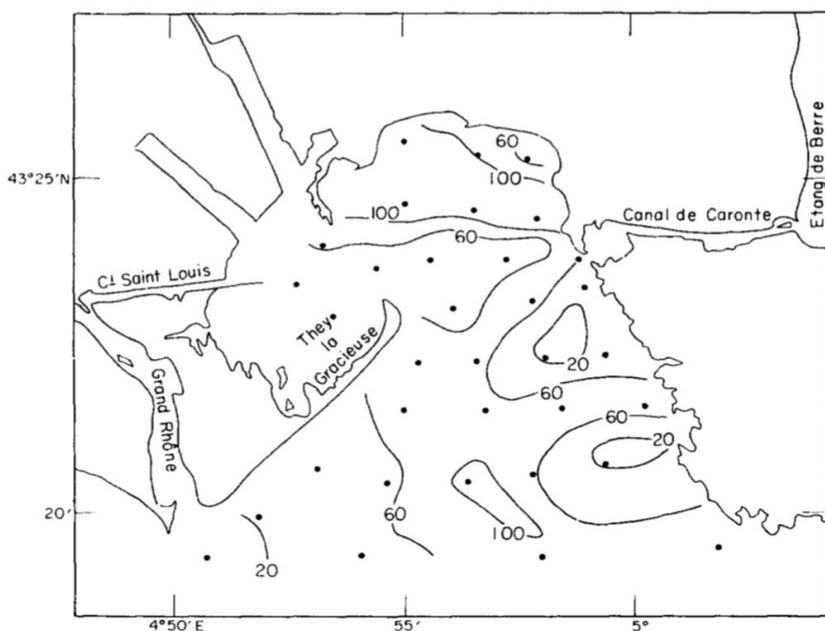


Figure 10 : Concentration en zinc dans le golfe de Fos selon Benon et al. 1978

Plusieurs études visant à mesurer la pollution en hydrocarbures dans le golfe de Fos ont été menées (Siron and Giusti 1990; Mille et al. 2007). Les niveaux d'hydrocarbures variaient de 10 à 260 mg par kg de poids sec de sédiment, et sont semblables aux concentrations côtières méditerranéennes. Les principales origines des hydrocarbures sont les émissions industrielles, principalement sidérurgiques ainsi que le trafic maritime et routier.

L'étude la plus récente est celle de Boudjellaba et al. (2016), qui rapporte les concentrations en sous-produits de chloration retrouvées dans le golfe de Fos. De nombreux sites industriels autour du golfe utilisent des volumes d'eau importants pour le refroidissement de leurs installations : centrales électriques (Combigolfe, Cycofos, EDF), sidérurgie (ArcelorMittal), raffineries (Lavera). Le golfe est aussi caractérisé par la présence de deux terminaux méthaniers d'envergure (Fos-Cavaou et Fos-Tonkin), qui emploient des systèmes de réchauffement afin de re-gazéifier le gaz naturel importé sous forme liquéfiée (GNL). Pour le terminal de Fos-Cavaou, cela représente un débit de 10 000 à 30 000 m³/h d'eau de mer prélevée puis rejetée en continu. Ces échanges thermiques peuvent provoquer des écarts de température de $\pm 5^{\circ}\text{C}$. Une contamination généralisée du golfe de Fos a été identifiée par Boudjellaba et al. (2016), avec des niveaux de bromoforme allant de 0,6 à 2,2 $\mu\text{g/L}$ et de dibromoacétonitrile allant de 0,9 à 1,0 $\mu\text{g/L}$ en hiver.

CHAPITRE 2 : Identification du niveau de pollution dans le golfe de Fos

La question d'étude d'impact ne peut être abordée sans une réelle connaissance de l'état du milieu. L'objectif ici est de qualifier et quantifier le niveau de pollution en DBPs du golfe, de la colonne d'eau à la faune endémique. Ce chapitre présente, les nombreuses techniques analytiques mises en jeu ainsi qu'un aperçu des niveaux de pollution dans différents compartiments du golfe.

1. Les sous-produits de chloration dans le milieu marin, méthodes d'analyses

Aujourd'hui il est difficile de connaître la réelle influence des rejets chlorés sur l'environnement. En effet, très peu d'études portent sur l'occurrence des DBPs dans les différents compartiments naturels (Chung et al. 2003; Boudjellaba et al. 2016; Manasfi et al. 2018). En milieu marin une grande partie de la recherche concerne les installations de dessalement de l'eau et les centrales thermiques ou nucléaires (Taylor 2006; Agus and Sedlak 2009; Khalanski and Jenner 2012). Ces études se limitent à quelques composés et à un seul point de rejet en haute mer. Les données sur la réactivité de certaines classes de DBP, sur leur comportement dans le milieu naturel, comme les bromophénols (Sim et al. 2009), sont particulièrement rares et couvrent rarement toutes les conditions physico-chimiques potentielles de salinité, température, courant. Pourtant les baies industrialisées souffrent généralement de nombreux rejets dans une zone étroite, ce qui entraîne probablement un stress des écosystèmes marins. Caractériser la pollution globale est une étape importante, pour en associer les risques potentiels et pour pouvoir ensuite modéliser et envisager des solutions avec les acteurs locaux.

Le golfe de Fos qui est ici étudié, reçoit les eaux chlorées de 7 industries différentes. De plus il abrite une large biodiversité ainsi qu'un grand parc à moules destinées à la consommation. Il y a donc, à plus large échelle, des enjeux, économiques, sanitaires et sociétaux. Dans le but de caractériser cette pollution le plus précisément possible, six campagnes de prélèvement d'eau ont été mises en place, couvrant ainsi un large spectre de conditions climatiques, une campagne de prélèvement de sédiments et plusieurs pêches d'oursins ont eu lieu.

2. Matériels et méthodes

2.1. Le déroulement des campagnes

2.1.1. Les campagnes « eau »

Six campagnes d'échantillonnage ont été réalisées (Tableau 3), couvrant les 4 saisons annuelles. Les stations d'échantillonnage quadrillent l'ensemble du golfe de Fos en incluant les 7 principaux débouchés industriels (Figure 12). A propos des noms des stations, les « x » représentent des exutoires, les points « m » représentent des points en

mer, les points « c » représentent les points dans le canal de navigation du Rhône et le Rhône, et les « p » pour les points situés dans le port. Pour chaque station, des échantillons d'eau ont été récupérés à l'aide d'une bouteille Niskin™ de 5L (General Oceanics, USA) en surface et en profondeur (en moyenne 7m). Deux litres ont été récupérés pour l'analyse des DBPs, l'un est acidifié avec 5 mL d'acide ascorbique à 120 g/L, afin de stopper toute réaction avec le chlore résiduel. L'autre est conservé avec du chlorure d'ammonium à 10g/L afin de pouvoir analyser les DBPs azotés. Enfin, 250mL sont prévus pour l'analyse des paramètres globaux. Tous les échantillons sont conservés à 4 °C et à l'obscurité jusqu'à l'analyse.

Les différentes conditions de courant pour chaque campagne ont été cartographiées et sont résumées sur la Figure 11.

Tableau 3: Récapitulatif des conditions météorologiques de chaque campagne

Campagne 1	Printemps (Avril 2017)	24 stations	Rejet Rhône = 600 m ³ /s Rejets chlorés ~ 105000 m ³ /h	SE 40 km/h
Campagne 2	Automne (Octobre 2017)	24 stations	Rejet Rhône = 550 m ³ /s Rejets chlorés ~ 105000 m ³ /h	NO 20 km/h
Campagne 3	Hiver (Février 2018)	24 stations	Rejet Rhône = 1600 m ³ /s Rejets chlorés ~ 87000 m ³ /h	NNE 5 km/h
Campagne 4	Été (Juin 2018)	24 stations	Rejet Rhône = 1500 m ³ /s Rejets chlorés ~ 80000 m ³ /h	Brise thermique
Campagne 5	Automne (Novembre 2018)	12 stations	Rejet Rhône = 1900 m ³ /s Rejets chlorés ~ 115000 m ³ /h	Brise thermique
Campagne 6	Printemps (Début juin 2019)	24 stations	Rejet Rhône = 1700 m ³ /s Rejets chlorés ~ 105000 m ³ /h	Brise thermique

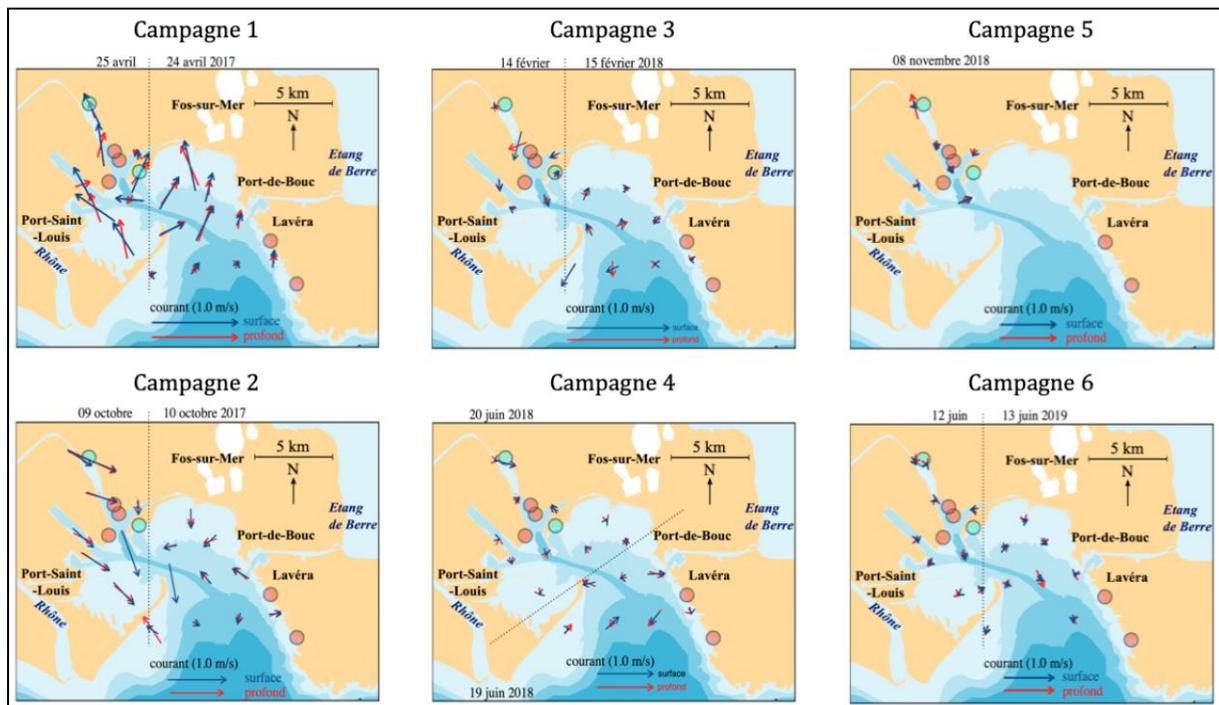


Figure 11 : Mesure du courant en surface et en profondeur (maximum 7m) pour chaque campagne.

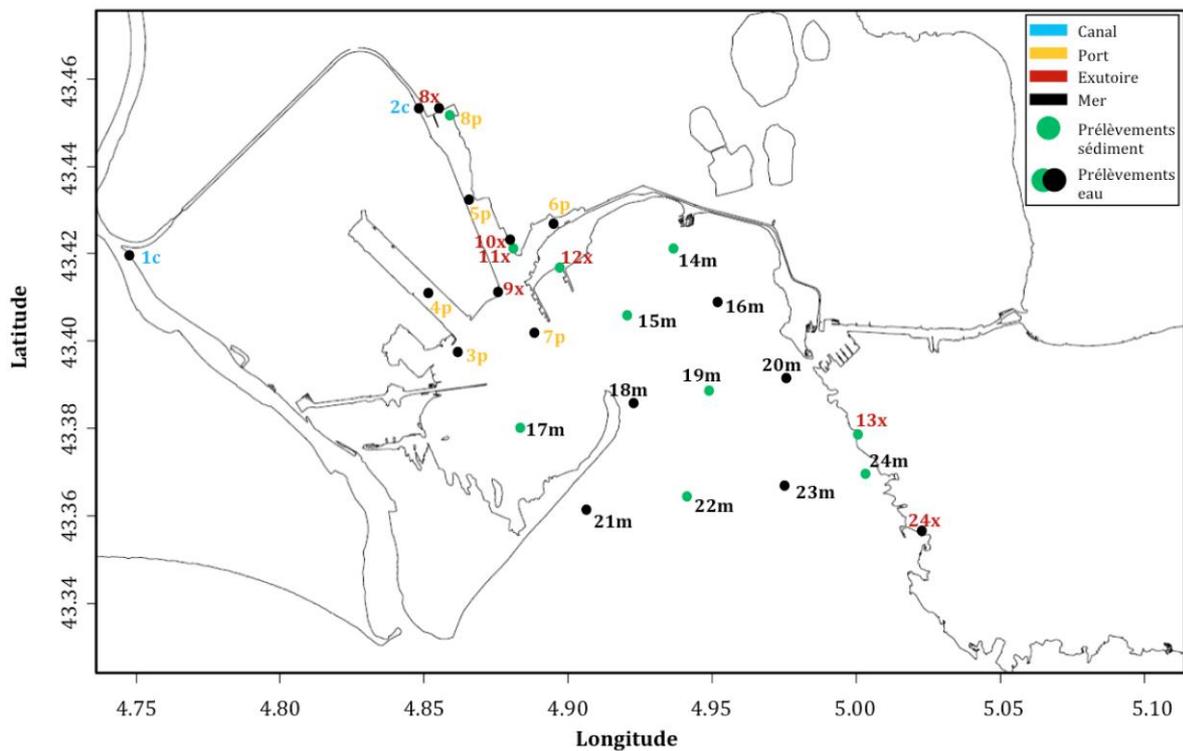


Figure 12 : Cartographie des points de prélèvement dans le golfe de Fos sur Mer.

En rouge les points aux exutoires, en jaune les points dans le port, en noir les points en mer et en bleu les deux points dans les canaux. Les points en verts, représentent les points de prélèvement pour l'analyse des sédiments, pour l'analyse de l'eau tous les points ont été prélevés. Les exutoires. 8x : Tonkin, 9x : Combigolfe, 10x : ArcelorMittal, 11x : Cycfos, 12x : Elengy, 13x : Lavéra, 24x : EDF.

La température, le pH, la salinité et la chlorophylle *a* ont été déterminés in situ pendant l'échantillonnage de l'eau à l'aide d'une sonde multi-paramètres de type CTD (MS5, OTT Hydrolab, Allemagne), dans toute la colonne d'eau. Le courant a également été mesuré avec un courantomètre de type ADCP (Acoustic Doppler Current Profiler, NORTEK modèle Aquadopp Profiler 600kHz).

2.1.2. La campagne « sédiment »

Le prélèvement des sédiments du golfe de Fos a été réalisé une seule fois, au printemps 2017, en parallèle avec la campagne d'eau n°1. Les sédiments ont été recueillis à l'aide d'une benne Ekman au niveau de 10 stations d'échantillonnage (8p, 11x, 12x, 13x, 14m, 15m, 17m, 19m, 22m, 24m) (Tableau 4, Figure 12). Les sédiments ont été stockés à 4 °C à l'abri de la lumière du soleil jusqu'à analyse.

Tableau 4 : Liste des échantillons prélevés pour l'analyse des sédiments

Prélèvements	Profondeur (m)
8p	7.4
11	6.5
12x	4.7
13x	8
14m	7.18
15m	11.5
17m	5.1
19m	24.5
22m	17.8
24m	6.2

2.1.3. Les campagnes de prélèvement d'oursin

Les pêches d'oursins ont eu lieu en hiver 2017, sur 1 semaine. Environ 50 oursins ont été pêchés en apnée sur 6 sites différents, plus ou moins proches des rejets industriels (Figure 13).

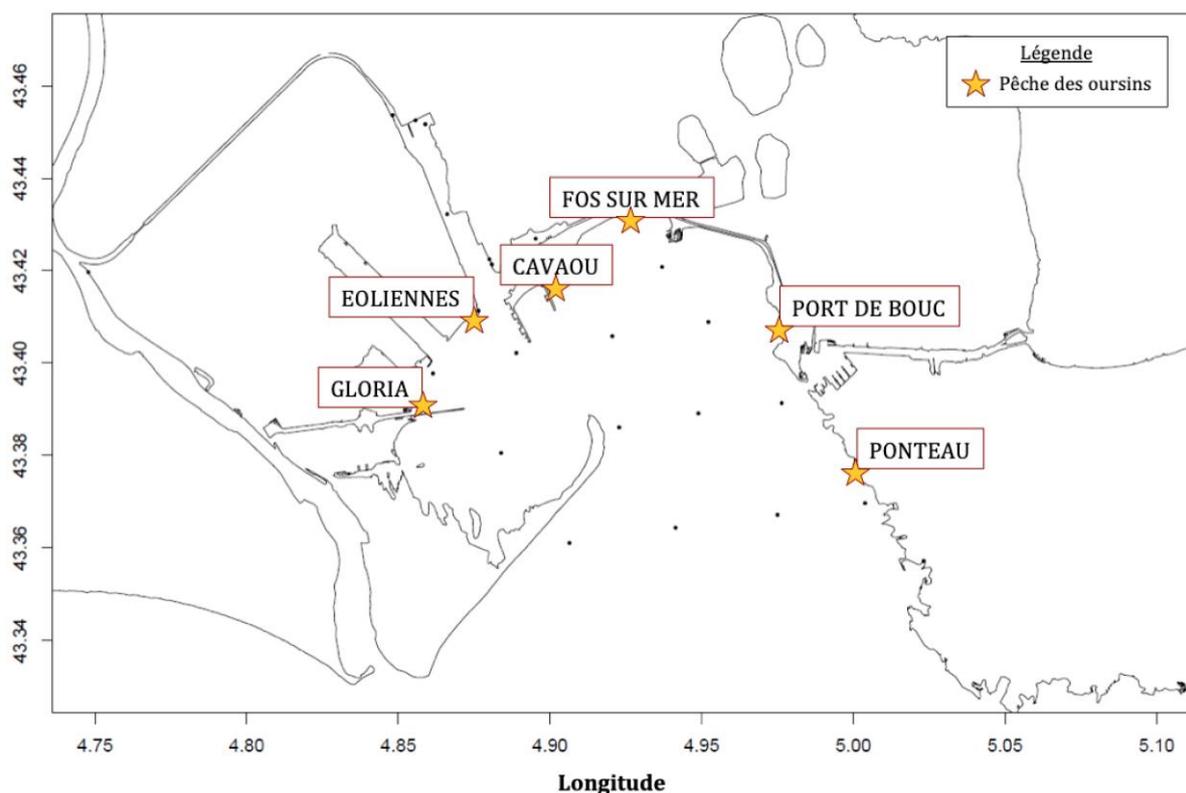


Figure 13 : Six différents points de prélèvement d'oursins

2.2. Méthodes analytiques

Tous les standards analytiques ont été obtenus auprès de Supelco/Sigma Aldrich (EU). Le tribromoacétaldéhyde (97 %) (Aldrich, Royaume-Uni) a été utilisé pour générer sa forme hydratée d'hydrate de bromal (BH) dans l'eau ultrapure (Millipore, résistivité >18 M Ω cm). Le 2-bromo-4-chlorophénol (98 %) et le 2,6-dibromophénol (99 %) ont été fournis par Alfa Aesar (Allemagne) et le 2,4-dibromophénol (95 %) et le 2,4,6-tribromophénol (99 %) par Sigma-Aldrich (États-Unis). Une solution mère étalon de chaque composé a été préparée dans de l'éther méthyl-tert-butylique (MTBE, pureté 99,8 % - Merck, Allemagne). L'acide ascorbique cristallin a été fourni par Sigma (Chine). L'acide sulfurique, réactif de qualité analytique, a été fourni par Fisher Scientific (Royaume-Uni). Pour tracer les courbes d'étalonnage, l'eau de mer artificielle a été enrichie avec les solutions mères de sels à différentes concentrations. L'eau de mer artificielle (ASW) a été préparée conformément à la norme ASTM D1141-98 (2013).

2.2.1. Extraction des composés à partir de la matrice d'eau

A partir de nos échantillons de 1L conservés dans l'acide ascorbique, 50mL sont nécessaires pour réaliser les extractions des trihalométhanes, des haloacétonitriles et de l'hydrate de bromal. L'étalon interne utilisé est le 1,2,3 trichloropropane conformément à la norme U.S.EPA 551 .1 (Munch et al. 1995). Le pH a été ajusté entre 4,5 et 5,5 par addition d'acide sulfurique si nécessaire. Les échantillons ont été ensuite extraits par extraction liquide-liquide (LLE) en ajoutant 5mL de MTBE et en agitant manuellement pendant 4 minutes. Ensuite, la phase organique a été collectée pour analyse. L'extraction est la même pour l'analyse des halonitrométhanés, cependant les échantillons utilisés sont ceux conservés avec du chlorure d'ammonium (Liew et al. 2012). Les sous-produits de chloration azotés sont très instables dans l'acide ascorbique, c'est pour cela qu'un autre agent de conservation : le chlorure d'ammonium suggéré par l'étude de (Liew et al. 2012) a été utilisé. Le chlorure d'ammonium ne peut être étendu à l'ensemble des analyses, car il ne stoppe pas l'action du chlore résiduel et l'échantillon d'eau ne cesse donc pas d'évoluer entre le moment du prélèvement et l'extraction.

Pour l'analyse des acides haloacétiques, la méthode 552.3 de l'US-EPA (Domino et al. 2004) a été utilisée avec de légères modifications. En résumé, des aliquots d'échantillons conservés dans l'acide ascorbique (40 mL) ont été acidifiées à un pH < 1 par addition d'acide sulfurique concentré et extrait avec 4mL de MTBE. L'acide 2,3-dibromopropionique a été ajouté aux extraits comme étalon. Après l'extraction liquide-liquide, la phase organique contenant les HAAs a été recueillie et transférée dans des flacons de 65 mL auxquels 7 mL de méthanol acidifié à 10% ont été ajoutés et placés dans un bain-marie à 50 °C pendant 2 h pour dériver les molécules (méthylation). La méthylation consiste à transformer un acide (-COOH) en ester méthylique (-COOCH₃). Un ester est nettement moins polaire que l'acide et donc plus volatil, par conséquent cette étape d'estérification améliore la qualité des résultats analytiques obtenus lors de leur séparation par chromatographie gazeuse. Après la dérivation, 4 mL de solution saturée de bicarbonate de sodium sont ajoutés à chaque échantillon avant de recueillir la phase organique contenant les esters d'HAAs.

Pour l'analyse des halophénols (HPs), la dérivation (acétylation) et l'extraction liquide-liquide (LLE) ont été effectuées en suivant la technique décrite par Allonier et al. (1999) avec quelques modifications. Des échantillons de 50 mL conservés dans l'acide ascorbique ont été mélangés manuellement pendant 4 minutes avec 10 g de carbonate

de sodium, 5 mL d'anhydride acétique et 20 µL de 2,4,6 trichlorophénol (étalon interne), pour dériver les HP. Les halophénols doivent être dérivés avant leur analyse en chromatographie gazeuse en raison de leur polarité élevée, qui peut induire une mauvaise résolution (pics larges) et diminuer la limite de détection. Le procédé de dérivation le plus efficace, le plus simple et le plus rapide est l'acétylation aqueuse, avec ajout de CH₃CO (Pizarro et al. 2010). 2,5mL de MTBE sont ensuite ajoutés aux échantillons, après 2 minutes d'homogénéisation les phases organiques sont récupérées.

Pour le dosage des fractions de composés organohalogénés totaux, un analyseur TOX300 Mitsubitshi a été utilisé. L'extraction est similaire à celle des THMs, avec un facteur de concentration plus important. Cent millilitres d'échantillon sont extraits avec 2,5mL de MTBE et 20 g de sulfate de sodium. Après 4 minutes d'agitation, la phase organique est récupérée.

Les phases organiques ont été conservées à -20 °C jusqu'à l'analyse. Les analytes ont été quantifiés à l'aide d'un étalonnage standard. Les étalonnages ont été effectués à des concentrations allant de 50 ng/L à 50 µg/L. Pour chaque gamme de concentration, des étalonnages externes ont été effectués à l'aide d'un ensemble de 7 solutions étalons. Les solutions ont été préparées en ajoutant l'étalon dans de l'eau de mer artificielle et en effectuant ensuite le même traitement que celui des échantillons. Des blancs de réactifs d'eau de mer et d'eau purifiée ont été inclus dans chaque séquence. L'analyse des échantillons a été effectuée en duplicat. Les limites de détection (LD), de quantification (LQ), les coefficients de linéarité et les taux de recouvrement pour chaque composé étudié sont présentés dans le Tableau 6.

2.2.2. Préparation des échantillons de sédiment

Les sédiments ont été ramenés à température ambiante et ont été homogénéisés dans des flacons pré-nettoyés en remuant vigoureusement avec des spatules en acier inoxydable. Les poids secs ont été déterminés en plaçant des aliquotes d'échantillon dans un four à 105 °C et pesés à intervalles de 24 heures jusqu'à ce que les différences de poids successives deviennent inférieures à 4 %. Pour l'analyse des halophénols dans les sédiments, la méthode s'inspire de Lampi et al. (1992) avec quelques modifications. Vingt grammes de sédiments humides ont été pesés, 50 mL de solution de NaOH 1M et 50 µL d'étalon interne 2,4,6 trichlorophénol à 1 mg/L, ont été ajoutés. Ensuite, 50 mL d'hexane ont été ajoutés à l'échantillon et le tout a été exposé pendant 10 minutes aux

ultrasons. La phase hexane a ensuite été éliminée, la phase aqueuse a été récupérée et introduite dans des flacons de verre de 65 mL qui ont été centrifugés à 2000 tr/min pendant 10 minutes. 40 mL du surnageant résultant ont ensuite été prélevés et traités selon les protocoles utilisés pour l'analyse des HP dans les échantillons d'eau décrits ci-dessus.

2.2.3. Extraction des phénols pour les oursins

Un total de 287 oursins a été récolté, avec des tailles comprises entre 5 et 7 cm. Par site, les gonades ont été regroupées dans 4 flacons de 250 mL, chacun contenant entre 10 et 15 individus. Après congélation à -55 °C, lyophilisation puis broyage (Restch MM400 : 25 Hz), les poudres destinées à l'analyse des DBPs, pesant entre 1 à 5 g ont été conservées à -45 °C jusqu'à l'extraction. Toutes les poudres ont été dopées avec 50 µL d'une solution standard à 10 mg/L de 2,4,5 trichlorophénol, puis diluées dans 5mL de MTBE. Le mélange est soumis à 30 minutes d'ultrasons avant d'être filtré sur PTFE 0,45 µM. Le filtrat est ensuite concentré sous azote jusqu'à un volume final de 0,5mL (TurboVap II). Pour augmenter l'affinité de l'analyte avec la phase stationnaire de la colonne SPE Florisil de purification, ce dernier est repris dans 5 mL d'hexane. Les phénols sont élués grâce à un mélange de solvant hexane/acétone (75 :25) et concentrés une dernière fois sous azote jusqu'à un volume final de 500 µL. Après une dilution au dixième dans du MTBE, les extraits sont conservés à -20 °C jusqu'à l'analyse (Mas et al. 2019).

2.2.4. Méthodes analytiques

Les oxydants résiduels libres et les oxydants résiduels totaux ont été mesurés par la méthode colorimétrique DPD en utilisant un spectrophotomètre portable (AQUALYTIC-AL 800, Allemagne). Les niveaux de bromure dans l'eau ont été mesurés par un système de chromatographie ionique ICS-3000 Dionex utilisant un éluant NaOH 30 mM avec un débit de 1,5 mL/min à 30 °C. Le carbone organique total (COT) et l'azote total (NT) ont été mesurés par oxydation catalytique à haute température (Multi N/C 2100, Analytik Jena, Allemagne). Des échantillons prétraités ont été injectés (50 µl) dans le four rempli d'un catalyseur préconditionné. La combustion a été réalisée à 800 °C et les produits de combustion ont été transportés par de l'oxygène de haute pureté (Linde Gas) permettant la détection du CO₂ par infrarouge non dispersif et la détection du NO par chimiluminescence.

Les extraits organiques contenant les DBPs ont été analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur à capture d'électrons ^{63}Ni (modèle GC-ECD Clarus 580, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). La chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électron est très répandue pour l'analyse des composés hautement électronégatifs tels que les composés halogénés (Hodgeson et al. 1990; Tominaga and Mídio 2003; Chinn et al. 2007). Le principe de la détection repose sur la circulation des molécules à la sortie de la colonne et de l'azote devant une source radioactive émettant des particules β . Les électrons génèrent un courant qui est mesuré. Lors du passage d'un composé dans le détecteur, des électrons vont être capturés et le courant est ainsi réduit. C'est cette variation de courant proportionnelle à la concentration en composé qui est mesurée. Une colonne capillaire Elite 5MS a été utilisée pour la séparation. L'hélium 5.0 a été utilisé comme gaz vecteur à 1 mL/min. L'azote a été utilisé comme gaz d'appoint à 30 mL/min. Les programmes de détection sont détaillés par famille dans le Tableau 5.

Tableau 5: Programmes de détection en GC-ECD en fonction des familles analysées

Programmes GC-ECD	
Trihalométhanes Haloacétonitriles Hydrate de bromal Halonitrométhanés	35°C (maintenue 22 minutes) → 145°C à 10°C/min (maintenue 2 minutes) → 260°C à 15°C/min (maintenue 5 minutes) → 280°C à 40°C/min (maintenue 5 minutes)
Acides haloacétiques	40°C → 65°C à 2,5°C/min (maintenue 2 minutes) → 85°C à 10°C/min (maintenue 2 minutes) → 2°5°C à 15°C/min (maintenue 25 minutes)
Halophénols	65°C (maintenue 5 minutes) → 220°C à 7°C/min → 240°C à 15°C/min (maintenue 8 minutes) → 310°C à 40°C/min (maintenue 20 minutes)
Halophénols oursins	65°C → 240°C à 2°C/min → 310°C à 40°C/min (maintenue 10 minutes)

Pour l'analyse des composés organohalogénés totaux, les échantillons ont été introduits dans un tube de combustion sous flux d'argon et d'oxygène (200 mL/mn). La combustion des composés organohalogénés extraits (EOX), suivie d'une étape de pyrolyse (900 °C), conduit à la formation d'halogénures d'hydrogène (HX) qui sont dosés, après déshydratation par coulométrie. L'introduction de vapeurs d'HX dans le réacteur contenant de l'acide acétique à 85% provoque une baisse du potentiel qui est

compensée par la génération d'ions Ag⁺ jusqu'au retour du potentiel initial. Selon la loi de Faraday, la quantité d'halogène (µg Cl⁻) est directement proportionnelle à la quantité d'ions Ag⁺ produits. Seuls les fluors ne sont pas dosés. La gamme de mesure s'étend de 0,05µg/mL à 50 µg/mL. La fiabilité de la méthode a été vérifiée au moyen du dosage d'une solution de concentration connue de 2,4,6-trichlorophenol diluée dans du MTBE.

Tableau 6: Paramètres de qualité analytique

Chemical (Unit)	DL	QL	RSD (%)	Recovery (%)	Range	Linearity (r ²)
			n=7 _ 0,1 µg/L			
Bromodichlorométhane (µg/L)	0,01	0,05	3,9	130	0,03-1,00	0,998
Dibromochlorométhane (µg/L)	0,01	0,03	4,1	93	0,03-1,00	0,999
Bromoform (µg/L)	0,01	0,04	4,5	99	0,02-1,00 1,00-20,00	0,997 0,991
Tribromonitrométhane (TBNM) (µg/L)	0,01	0,07	1,2	111	0,1 - 5	0,997
Dibromiodométhane (DBIM) (µg/L)	0,07	0,1	10	157	0,05 - 5	0,99
			n=7 _ 0,05 µg/L			
Hydrate de bromal (BH) (µg/L)	0,01	0,04	5,3	149	0,03-1,00	0,999
			n=10 _ 0,1 µg/L			
Monobromoacétonitrile (BAN) (µg/L)	0,02	0,07	12	117	0,01 - 5	0,991
Dichloroacétonitrile (DCAN) (µg/L)	0,01	0,02	2,7	93	0,02-2,00	0,998
Trichloroacétonitrile (TCAN) (µg/L)	0,04	0,16	11,2	87	0,10-1,00	0,993
Bromochloroacétonitrile (BCAN) (µg/L)	0,01	0,02	3,6	75	0,02-2,00	0,999
Dibromoacétonitrile (DBAN) (µg/L)	0,01	0,02	3	85	0,02-2,00	0,999
			n=8 _ 0,05 µg/L			
2-Bromo 4-chlorophénol (2B4CP) (µg/L)	0,01	0,02	6	95	0,01-1,00	0,999
2,6 Dibromophénol (2,6 DBP) (µg/L)	0,01	0,03	6	104	0,03-0,60	0,995
2,4 Dibromophénol (2,4 DBP) (µg/L)	0,01	0,02	4	107	0,02-1,00	0,999
2,4,6 Tribromophénol (2,4,6 TBP) (µg/L)	0	0,01	1,6	138	0,03-1,00	0,992
			n=8 _ 0,5 µg/L			
Monobromoacétique acide (MBAA) (µg/L)	0,9	2,7	15	84	3,0-10	0,991
Dichloroacétique acide (DCAA) (µg/L)	0,08	0,28	6,1	91	0,3-2,0	0,994
Trichloroacétique acide (TCAA) (µg/L)	0,12	0,43	9,2	92	0,3-2,0	0,996
Bromochloroacétique acide (BCAA) (µg/L)	0,11	0,38	6,8	111	0,3-5,0	0,999
Dibromoacétique acide (DBAA) (µg/L)	0,1	0,3	6,9	91	0,3-2,0	0,996
Bromodichloroacétique acide (BDCAA) (µg/L)	0,09	0,31	10,7	116	0,3-2,0	0,992
Chlorodibromoacétique acide (CDBAA) (µg/L)	0,12	0,44	6,9	128	0,5-5,0	0,994
Tribromoacétique acide (TBAA) (µg/L)	0,14	0,45	7,9	113	0,5-5,0	0,994
			n=7 _ 0,1 mg/L			
Chlore résiduel libre (mg/L)	0,03	0,1	36	102	0,1-1,0	0,993
Chlore total (mg/L)	0,03	0,1	36	102	0,1-1,0	0,993
			n=7 _ 1 mg/L			
Carbone organique total (TOC) (mg C/L)	0,11	0,33	2,4	144	0,3-3,0	0,99
			n=7 _ 1 mg/L			
Azote total (TN) (mg N/L)	0,17	0,51	9,7	270	0,2-2,0	0,99

2.3. Analyses statistiques

Afin de pouvoir comparer tous les paramètres mesurés dans la colonne d'eau, nous avons exprimé toutes les concentrations en $\mu\text{g/L}$ équivalent brome. Les statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (version 3.6.1, 2019). Pour décrire les corrélations ainsi que les relations entre pollution-environnement, des tests de Pearson ont été réalisés et des analyses en composantes principales, avec le package FactoMiner également. Une classification descendante hiérarchique a été utilisée pour différencier des groupes ayant le même comportement avec ce même package.

Le test Kruskal-Wallis a été utilisé pour déterminer les différences statistiquement significatives entre nos différents groupes : la pollution, les paramètres physico-chimiques de l'eau et les nutriments. Le seuil de signification retenu a été fixé à 5%.

3. Résultats et discussion

Dans une première étape nous verrons les niveaux de pollution dans l'eau, avant de s'intéresser d'un point de vue plus statistique, aux différentes interactions environnement-pollution. Ensuite les niveaux de pollution des autres compartiments étudiés seront exposés et discutés à leur tour.

3.1. Distribution des sous-produits de chloration dans l'eau

3.1.1. Diversité des sous-produits de chloration

Les concentrations en THMs mesurées lors des 6 campagnes varient entre 10 ng/L et 30 $\mu\text{g/L}$ toutes stations confondues. Le bromoforme est le composé largement majoritaire de cette famille de DBPs, représentant 90% des THM totaux. On le retrouve jusqu'aux stations d'échantillonnage les plus éloignées des exutoires à des concentrations de l'ordre d'une dizaine de nanogrammes par litre. On ne retrouve pas de corrélation significative entre le taux de THM et le carbone organique dissous. Dans cette étude leur formation dépend prioritairement de la quantité d'eau chlorée rejetée dans le golfe ($R^2=0,992$ et une valeur de $p = 10^{-11}$).

Les acides di- et tri-bromoacétiques représentent 99% des HAAs totaux formés. L'équilibre entre ces deux formes dépend principalement des paramètres physico-chimiques. Lors de la campagne n°5 et n°6 le pH est significativement plus faible que pour les autres campagnes, le di-HAA est sensiblement plus abondant.

Les concentrations maximales mesurées en HAAs totaux sont élevées autour de 10 µg/L. Les acides haloacétiques sont des composés non volatils, polaires et très stables dans l'eau, ils peuvent ainsi s'accumuler (Lagiere et al. 2017). De plus les HAA sont les sous-produits de dégradation ultimes de la famille des DBPs azotés (Lagiere et al. 2017).

Les concentrations en bromoacétonitriles sont comprises entre 40 ng/L et 1,5 µg/L. Le dibromoacétonitrile est le composé retrouvé majoritairement lors des campagnes sur le golfe de Fos sur mer, représentant 90% des HAN totaux. Les haloacétonitriles ne sont pas des sous-produits très stables en milieux aqueux, et une partie significative des HANs peut être hydrolysée (Lagiere et al. 2017). L'hydrolyse à pH alcalin conduit à la formation d'haloacétamides puis d'acides haloacétiques comme sous-produits ultimes (Krasner et al. 2006). Leur concentration est corrélée à la concentration en azote total de l'eau, $p=0,021$.

Les concentrations en halophénols sont rarement au-dessus de la limite de détection lors des 6 campagnes. Quelques points toutefois ressortent. La concentration maximale retrouvée en bromophénols est de 0,4 µg/L. Le 2,4,6 tribromophénol est le seul composé qui a été dosé en GC-ECD. D'autres formes de phénols sont certainement présentes mais nécessiteraient une étape de pré-concentration nettement plus importante. D'autres études en parallèle de ce projet auraient détecté à l'aide de capteurs passifs la présence de mono- et dibromo- phénols (Données non encore publiées). La présence d'halophénols n'est pas corrélée avec le COT, et n'est même pas toujours corrélée avec les exutoires ou les courants (Figure 11). En effet, des concentrations parfois plus élevées ont été retrouvées au niveau des points « port ». La cinétique de formation des halophénols entre brome et substances humiques est encore mal connue. Cette observation témoigne soit d'un temps de réaction plus important pour la formation des halophénols, soit d'un autre facteur de formation, indépendant des rejets chlorés industriels. En effet dans le golfe de Fos, une multi-pollution a largement été établie et la présence de PCB, PBDE peut influencer la formation des phénols (Harju et al. 2009; Fisk et al. 2010; Covaci et al. 2011).

Dans l'ensemble, les concentrations de DBPs détectées dans le golfe de Fos sont du même ordre que les pollutions déjà décrites. Dans une étude menée dans des centrales électriques côtières, au point de rejet, les concentrations de bromoforme variaient entre 3,1 µg/L et 29,20 µg/L et les concentrations de HAN variaient de 0,10 à 11,39 µg/L

(Jenner et al. 1997; Allonier et al. 1999; Khalanski and Jenner 2012; Boudjellaba et al. 2016).

Concernant les concentrations en EOX, donc en composés organohalogénés totaux, il n'existe aucune corrélation avec les différentes familles de DBPs. Lorsque l'on regarde la distribution sur la Figure 14 des concentrations en fonction des sites « mer », « port », « exutoire » et « canal », on voit très clairement que pour les composés mesurés en GC-ECD, les concentrations les plus élevées sont retrouvées proches des exutoires, alors que pour l'EOX, aucun site n'est significativement plus élevé qu'un autre. Ceci peut s'expliquer, soit par une pollution halogénée (PCB, PBDE) dans le golfe très importante qui « masque » la pollution aux DBPs, soit par une contamination systématique lors de l'extraction par un peu de chlorure qui passerait en phase organique et influencerait notre signal. Ces valeurs-là ne sont donc pas fiables et ont été écartées des analyses statistiques.

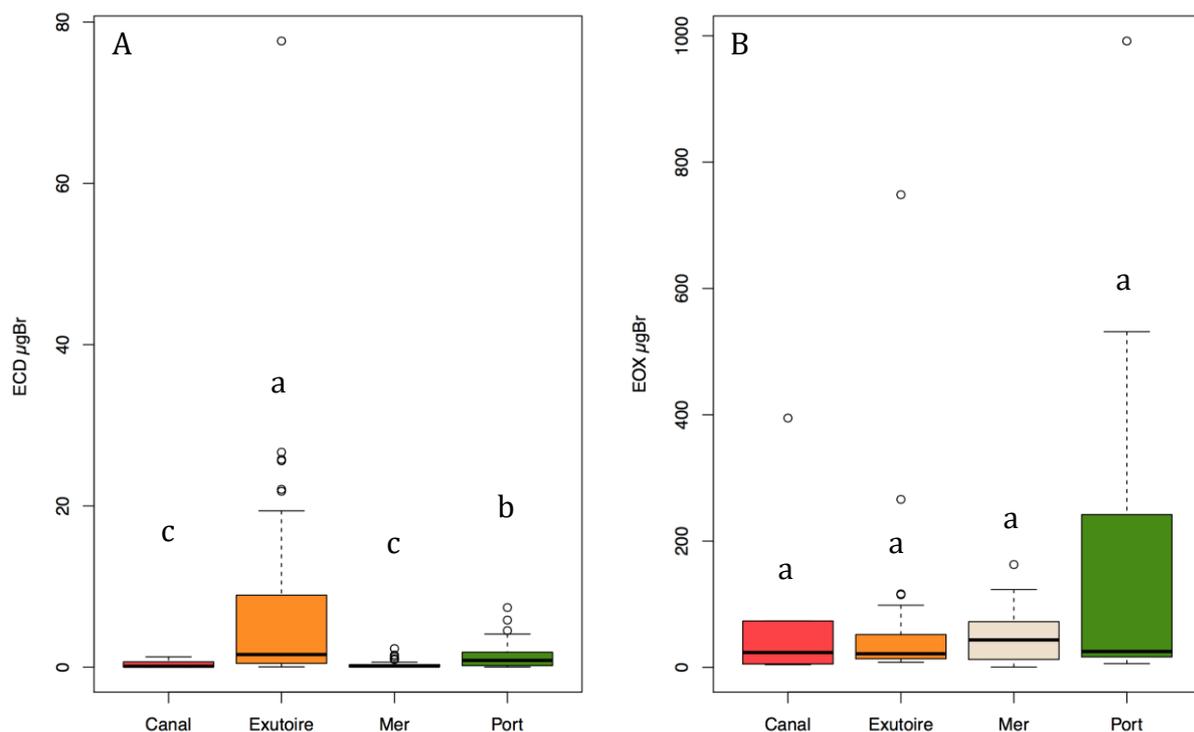


Figure 14: Distribution de la pollution en sous-produits de chloration (A) et en composés organohalogénés totaux (B) en fonction des sites de prélèvement pour les 6 campagnes.

La différence statistique entre les conditions est sous forme de lettre, selon le test Dunn.

Sur 6 points de prélèvement lors de la première campagne uniquement, des analyses effectuées par un partenaire du projet de recherche FOS-SEA, nous ont permis d'obtenir les valeurs de composés organohalogénés totaux pour ces échantillons. Il s'agit des

points, 4p, 8p, 9x, 10x, 11x et 13x. Ces valeurs nous permettent d'obtenir une contribution ponctuelle moyenne des grandes classes de sous-produits de chloration dosées en GC-ECD. La contribution moyenne des THM au paramètre EOX est de l'ordre de 3,5% uniquement, avec un minimum de 0,2%. Les acides haloacétiques contribuent en moyenne de la même façon que les THM sur les 6 points analysés, avec un minimum de 0 puisque sur un point, aucun HAA n'a été détecté. Les haloacétonitriles eux contribuent moins, avec une moyenne de 0,8%. Ces observations confirment l'hypothèse que la majorité des halogénés mesurée en EOX, soit en moyenne 94%, n'ont pas été mesurés lors de la 1^{ère} campagne. Les rejets chlorés industriels pourraient représenter qu'une petite partie du total halogénés du golfe ou alors la grande majorité des DBPs ne sont pas encore connus (Tableau 7).

Tableau 7 : Proportions des différentes familles de DBPs par rapport aux composés organohalogénés totaux mesurés

	Unité	Moyenne	n	Min	Max
AOX	µgBr	40	6	22	94
Trihalométhanes	%	3,5	6	0,2	8
Haloacétonitriles	%	0,8	6	0	3
Acides haloacétiques	%	3,3	6	0	7
Total	%	6	6	0,2	17

Globalement sur les 6 campagnes, les concentrations en DBPs les plus importantes ont été retrouvées lors de la dernière campagne, n°6 (Figure 15).

La campagne n°3 est caractérisée par un taux très faible de DBPs, c'est la seule campagne qui s'est déroulée en plein hiver, avec une eau dans le golfe avoisinant les 8°C. A ces températures, les industriels n'ont pas besoin de chlorer. Cette observation confirme une fois de plus l'origine anthropique des sous-produits mesurés dans le golfe.

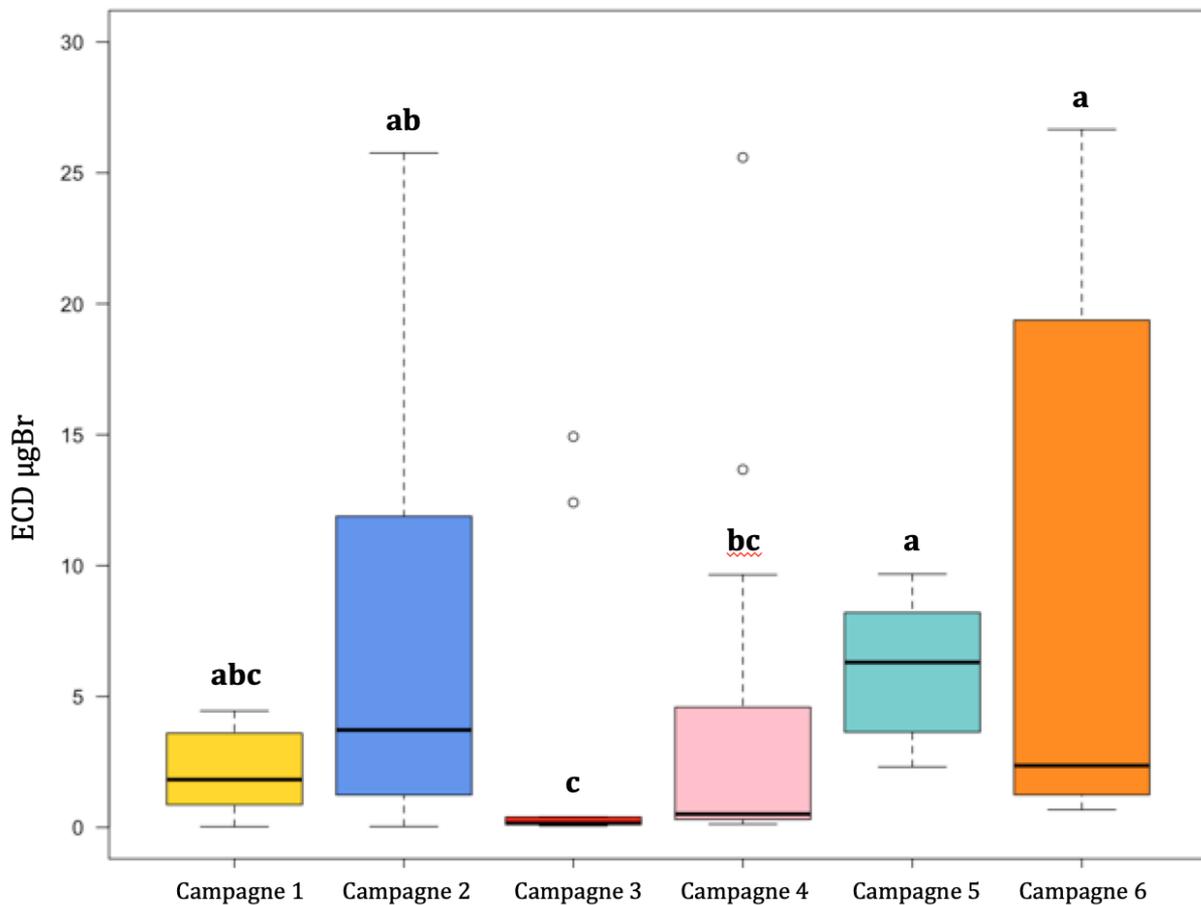


Figure 15 : Niveau de pollution aux DBPs en fonction des campagnes.

Toutes les données pour chaque campagne ont été exprimées en ug/L équivalent Br, et ont contribué aux boxplots. n = 48, sauf pour la campagne 5, n= 24.

Les performances analytiques n'ont fait que s'améliorer avec le temps et donc avec les campagnes, c'est pour cette raison que pour montrer la diversité des produits susceptibles de se former au niveau des exutoires suite à la chloration de l'eau, nous nous focaliserons sur la sixième campagne.

Au maximum, nous avons dosé 15 DBPs différents au niveau d'une seule et même source. Les composés qui n'ont jamais été identifiés jusqu'alors dans le milieu marin, en sortie de rejet chlorés, sont le tribromonitrométhane et le dibromoiodométhane. On les retrouve dans les 4 rejets en activités sur les 7, Tonkin, Arcelor, Cycofos et Elengy. En effet, leur non-détection au niveau des différents points du golfe s'explique par la limite de détection trop élevée pour pallier l'effet de dilution du golfe.

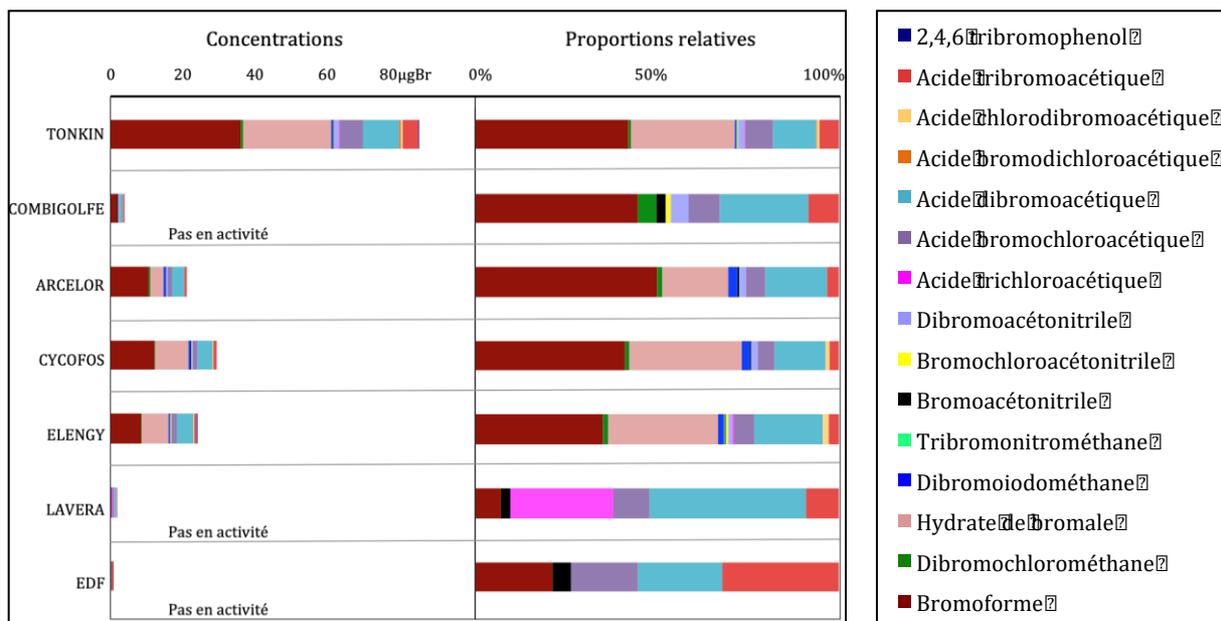


Figure 16 : Liste des DBPs formés aux exutoires

La Figure 16 montre que la distribution en DBPs est semblable pour les rejets chauds ou froids, en activité. L'exutoire « CombigoLfe » est situé très proche de « Arcelor Mittal » et « Cyclofos », on peut voir dans les proportions relatives, que le composé qui a disparu est l'hydrate de bromal, or c'est le moins stable et le plus volatil des DBPs étudiés. Il se dégrade très rapidement en bromoforme ou alors est volatilisé (Manasfi 2016). On peut également constater qu'entre ces rejets, qui sont séparés d'un kilomètre, on a déjà un facteur 6 de dilution.

Lorsqu'on s'intéresse au rejet « Lavera », site pétrochimique, l'acide trichloroacétique a été retrouvé. Dans le milieu marin la formation de DBPs chlorés est rare. Cet acide rentre dans la fabrication d'herbicides et d'agents décalcifiants, on peut donc naturellement suspecter une légère pollution ponctuelle industrielle. Concernant le rejet « EDF », les concentrations sont très faibles, ne dépassant pas 1 µg/L en DBPs totaux, ce jour-là, la chloration n'était pas en activité, on peut donc supposer que les traces que l'on détecte sont des bruits de fond, anthropiques ou naturels de la zone.

Maintenant, analysons l'influence des paramètres extérieurs sur la formation de ces sous-produits.

3.1.2. Influence des paramètres environnementaux sur la formation des DBPs

Tout d'abord, concernant les paramètres physico-chimiques des campagnes, on peut voir sur la Figure 17, que chaque campagne possède ses propres caractéristiques. La formation de DBPs en découle directement.

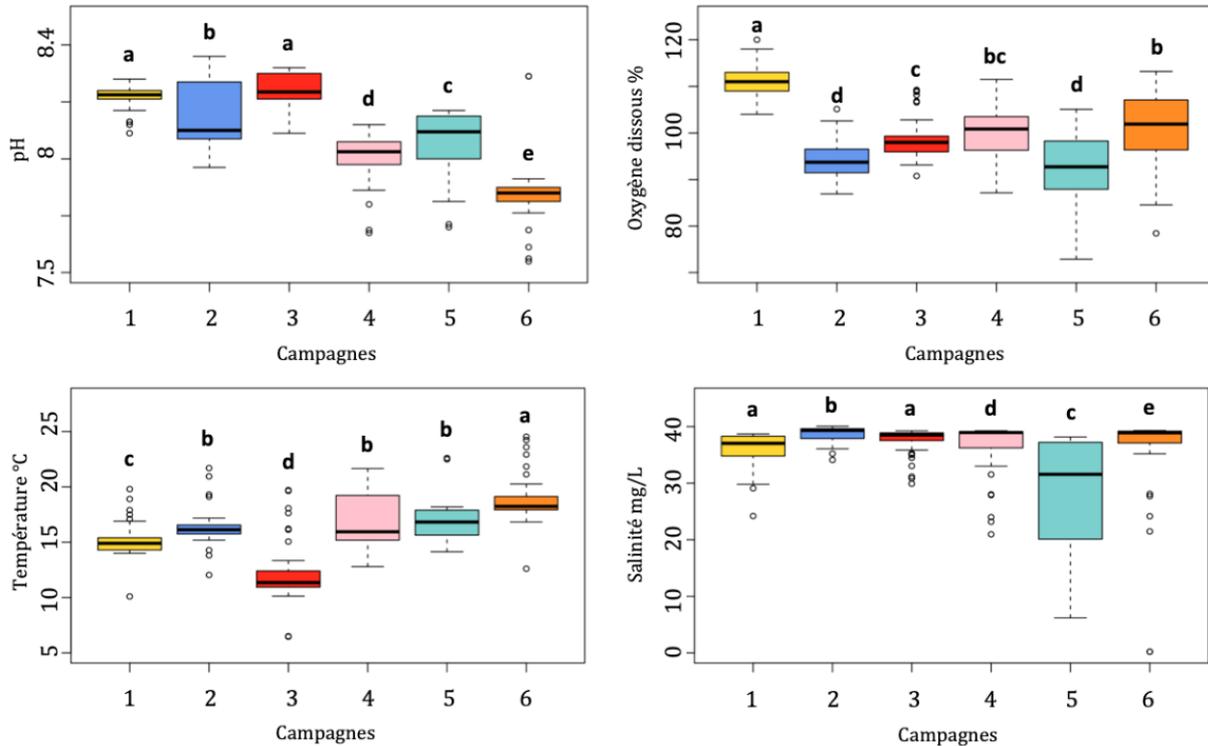


Figure 17: Paramètres physico-chimiques en fonction des campagnes
Résultats pour tous les points de prélèvements surface-profondeur. n = 48, sauf pour la campagne 5, n= 24

Il a été démontré que le pH est un facteur qui affecte la spéciation des DBPs (Cimetiere et al. 2010). Hansen et al. (2012) ont démontré qu'avec la diminution du pH, la formation de THM et de tri-HAA diminuait, la formation de HAN augmentait alors que cela n'aurait pas d'impact sur les di-HAA. Ce sont des propriétés chimiques que l'on ne peut pas vérifier avec nos analyses, car en milieu naturel d'autres facteurs influencent davantage la formation des DBPs que la faible variation de pH enregistrée notamment lors de la campagne 6. En effet, si on regarde la Figure 18, qui détaille les concentrations retrouvées en fonction des familles de DBPs et des campagnes, on voit bien que lors de la campagne 6, aucune diminution en THM et aucune augmentation en HAN ne sont clairement visibles. Les volumes d'eaux industrielles chlorées rejetés masquent les variations liées aux paramètres physico-chimiques.

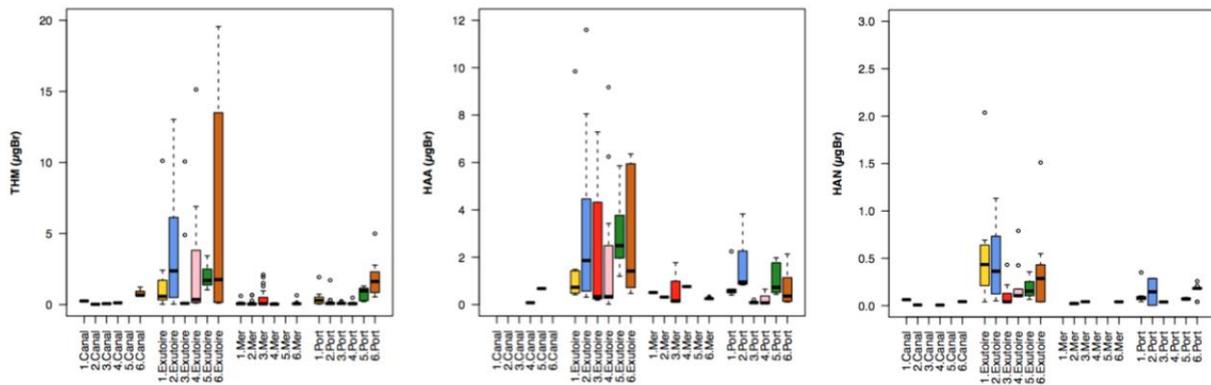


Figure 18 : Niveaux de pollution pour les différentes familles de DBPs, THM, HAA et HAN en fonction des campagnes et des sites de prélèvement.

La température a un rôle important dans la dispersion des DBPs et donc sur leur dilution. Lorsque que les températures diminuent, la volatilisation diminue. De plus si l'air est plus froid que l'eau de mer cela entraîne un refroidissement des eaux de surface qui vont être plus denses et plonger. Parallèlement, lorsque les températures sont trop froides (inférieures à 10 °C), la chloration de l'eau de mer n'est plus nécessaire. C'est d'ailleurs le cas de la campagne 3, où la température dans les darses était inférieure à 10 °C, la chloration n'a pas eu lieu pour tous les exutoires, les teneurs en DBPs sont très faibles (Figure 15). Lors de la campagne 4, les valeurs de température sont constantes dans le golfe, aucun point n'est considéré comme cas particulier.

L'oxygène dissous affecte également nos résultats, car cela régule directement la vie aquatique. En effet, une forte concentration en oxygène est souvent liée à la présence de chlorophylle. Or on sait que la formation de DBPs dépend de la matière organique et que certains sont naturellement produits, notamment par les algues. La campagne la plus riche en oxygène dissous est la première (automne), toutefois ce n'est pas la campagne la plus riche en DBPs. Cependant lorsqu'on regarde le taux de DBPs azotés, les haloacétonitriles, la campagne 1 semble être sensiblement la plus riche par rapport à la campagne 2 et nettement par rapport aux autres campagnes. On ne peut pas vraiment conclure sur la réelle influence de l'oxygène, car selon l'analyse du carbone organique total et de l'azote total, la campagne 1 ne se différencie pas des autres campagnes.

La salinité va également jouer un rôle important dans la dispersion des polluants étant donné que les variations de salinité génèrent des masses d'eaux non homogènes, concentrant ainsi les composés à la surface ou en profondeur en fonction de l'halocline.

De plus une diminution de la salinité peut être induite par une entrée d'eau douce du Rhône conséquente et donc riche en matière organique ou en polluants susceptibles d'influencer la formation de DBPs. Lors de la campagne 5, la salinité est significativement plus faible, en effet cette campagne a eu lieu juste après un phénomène météorologique important, caractérisé par une pluviométrie de 37 mm la semaine précédant les prélèvements, sans brise enregistrée, les masses d'eau n'ont pas eu le temps de se mélanger. Ce mois de novembre 2018 est d'ailleurs caractérisé par une augmentation de + 177 % de précipitations par rapport aux moyennes enregistrées entre 1981 et 2010. Ce phénomène est d'ailleurs confirmé par le modèle météorologique de Prévis mer, illustré en Figure 19, sur lequel la couleur violette témoigne d'une salinité de l'ordre de 11 mg/L visible dans les darses du golfe.

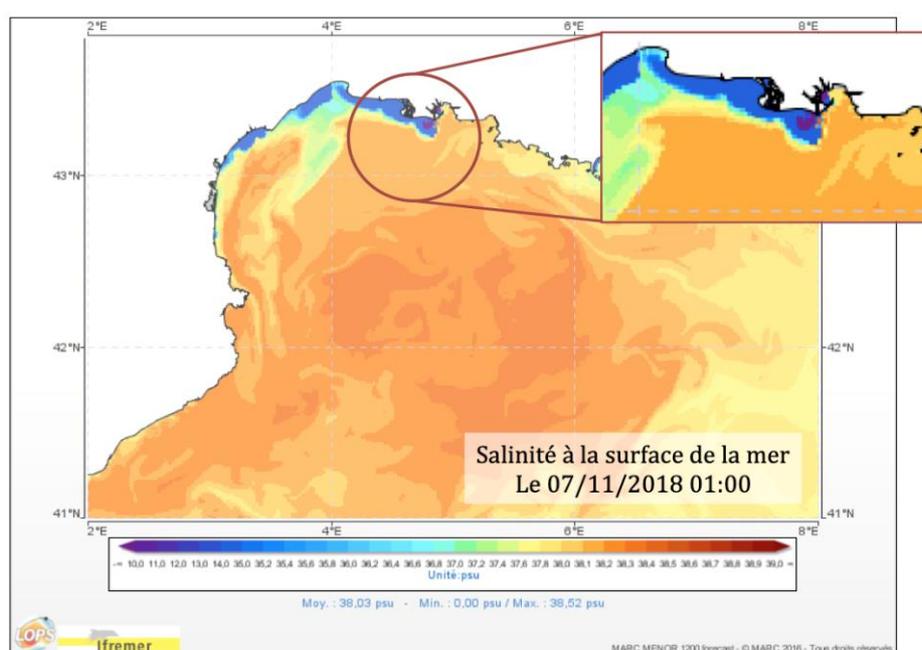


Figure 19 : Modèle de salinité en Méditerranée le 7 novembre 2018, jour de la campagne n°5
https://marc.ifremer.fr/resultats/temperature_et_salinite

Pour évaluer l'impact de ces facteurs, une première analyse en composante principale (ACP) regroupant l'ensemble des paramètres mesurés pour chaque campagne, nous permet de séparer 3 groupes de variables qui vont influencer la distribution de nos différents points de prélèvement (Figure 20 A). En effet, on retrouve un groupe de variables projeté sur l'axe 1 qui inclut tous les sous-produits de chloration mesurés. Il est à noter que toutes les familles de polluants suivent le même axe donc varient de la

même manière en fonction des points de prélèvement. Cet axe explique 33% des variations. Le deuxième groupe de variables plutôt projeté le long de l'axe 2, est divisé en deux sous-groupes qui s'opposent le long de cet axe. Il s'agit des paramètres physico-chimiques et des nutriments. Ce second groupe explique 23% de la variabilité. Il n'y a donc pas de corrélation entre ces deux groupes et l'augmentation des DBPs sur cette ACP globale. Sur la Figure 20B, ce sont les différents points de prélèvement qui sont regroupés en fonction de trois variables qualitatives. On voit que lorsqu'on projette l'intégralité des paramètres, les exutoires se différencient, largement projetés sur l'axe 1, donc expliqués par les fortes concentrations en DBPs. On voit également que lorsque l'on sépare les points par campagne, les campagnes ne sont pas projetées sur les axes de la même façon. La campagne 5 est davantage projetée sur l'axe 2 : axe caractérisé par le groupe des paramètres physico-chimiques qui s'opposent à celui des nutriments. Il est important de rappeler que lors de la campagne 5, seulement 12 points ont été prélevés, tous proches des exutoires et aucun en mer. En revanche, lorsque l'on teste la différenciation des points selon la surface ou la profondeur, il n'y a pas différence significative, par la suite ils seront donc confondus.

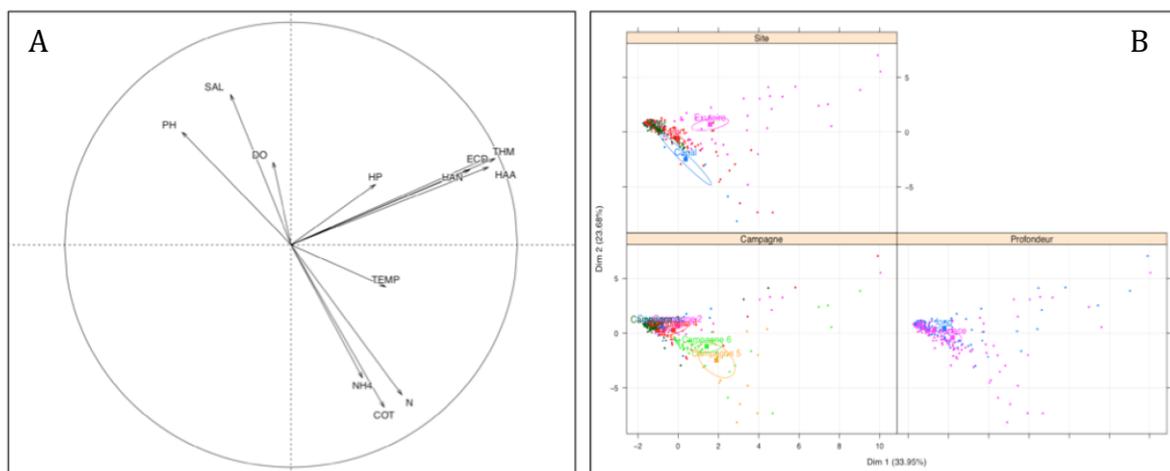


Figure 20 : Analyse en composante principale sur l'ensemble des données des campagnes

A : projection des variables B : projection des individus en les différenciant selon 3 critères : le site de prélèvement, la campagne et la profondeur.

A partir des variables entrant dans l'ACP, la classification descendante hiérarchique, a permis de distinguer 3 groupes ou cluster (Figure 21). Le cluster 1 est corrélé à l'azote, le carbone organique et la température. Le cluster 2 qui est corrélé au pH, la salinité et l'ammonium. Le cluster 3 est corrélé aux données obtenues en GC-ECD. Dans le cluster 3, on retrouve uniquement des points correspondant aux exutoires. Une analyse avec uniquement les points aux exutoires ne met pas en évidence un effet campagne ou un effet profondeur.

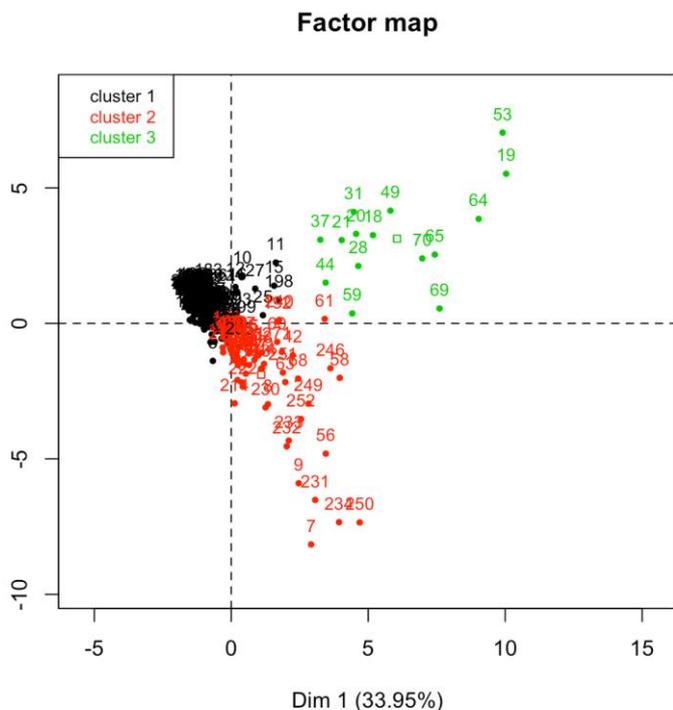


Figure 21 : Classification descendante hiérarchique sur l'ensemble des données des campagnes

Il est à noter que malgré les conditions météorologiques différentes selon les campagnes, les variations aux exutoires ne sont pas campagnes-dépendantes. Si on regarde cette fois la Figure 22, qui représente la distribution de la pollution en DBPs, selon les campagnes et selon les sites de prélèvement, on peut remarquer que la pollution est très marquée aux exutoires, se dilue nettement dans les « ports » et en mer la pollution est moindre, puisqu'elle est similaire à celle retrouvée dans le Rhône qui ne subit pas d'intrants provenant des rejets industriels chlorés.

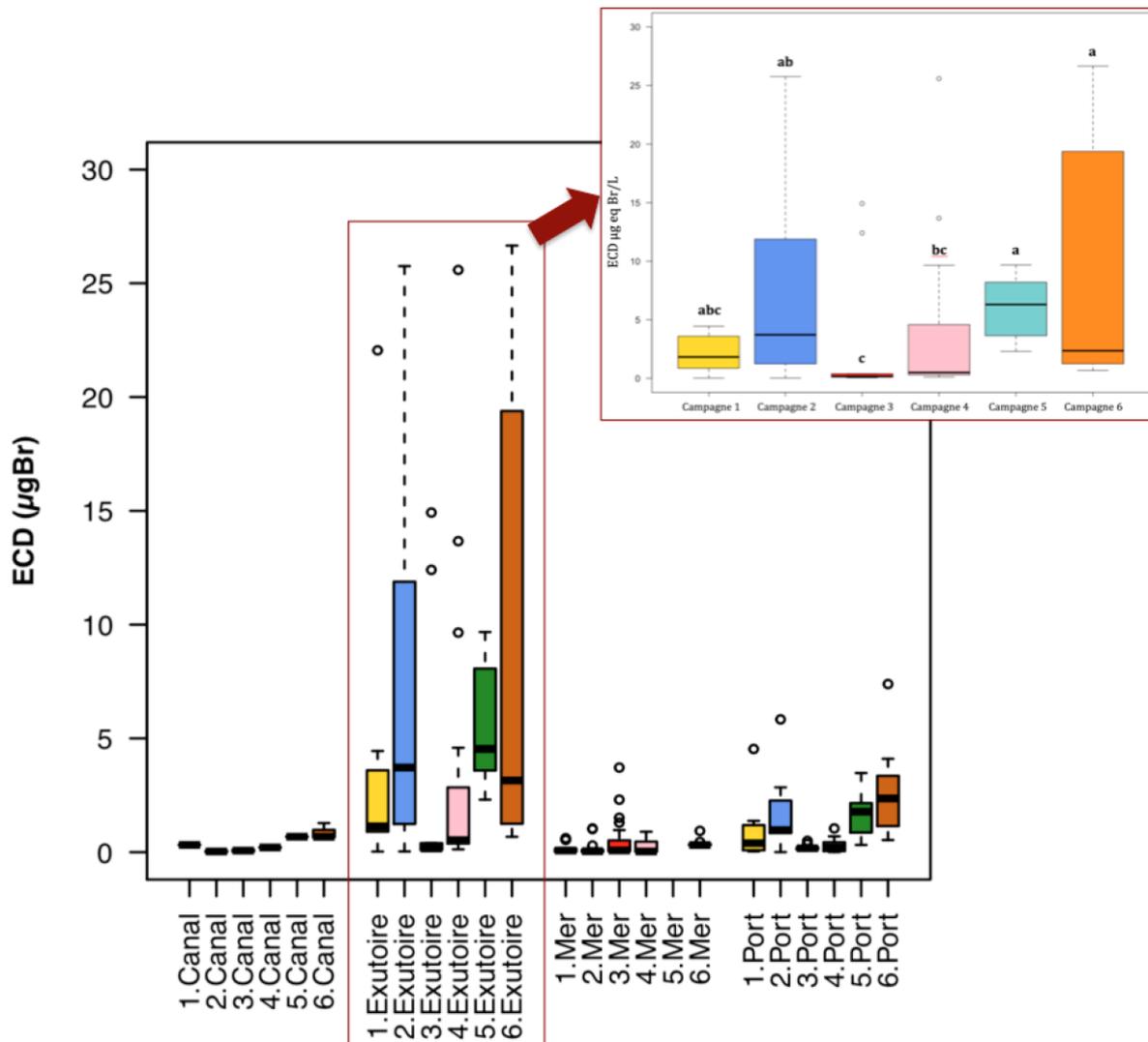


Figure 22 : Boxplot des concentrations en DBPs trouvées selon les sites et les campagnes

De plus, si on effectue un zoom sur les résultats des prélèvements aux exutoires Figure 22 on s'aperçoit que le niveau de pollution selon les campagnes n'est que très légèrement différent, sauf pour la campagne 3 qui est statistiquement plus faible ($p = 0.003$). Il en ressort donc que malgré des conditions météorologiques variables, la pollution en sous-produits de chloration ne dépasse pas les nanogrammes par litre en sortie du golfe. Les concentrations en DBPs dépendent prioritairement de l'activité industrielle, puisque la seule saison qui se détache nettement est l'hiver où l'eau est suffisamment froide pour limiter les développements bactériens, la chloration est moindre. La pollution du golfe est interpolée (krigeage) en Figure 23.

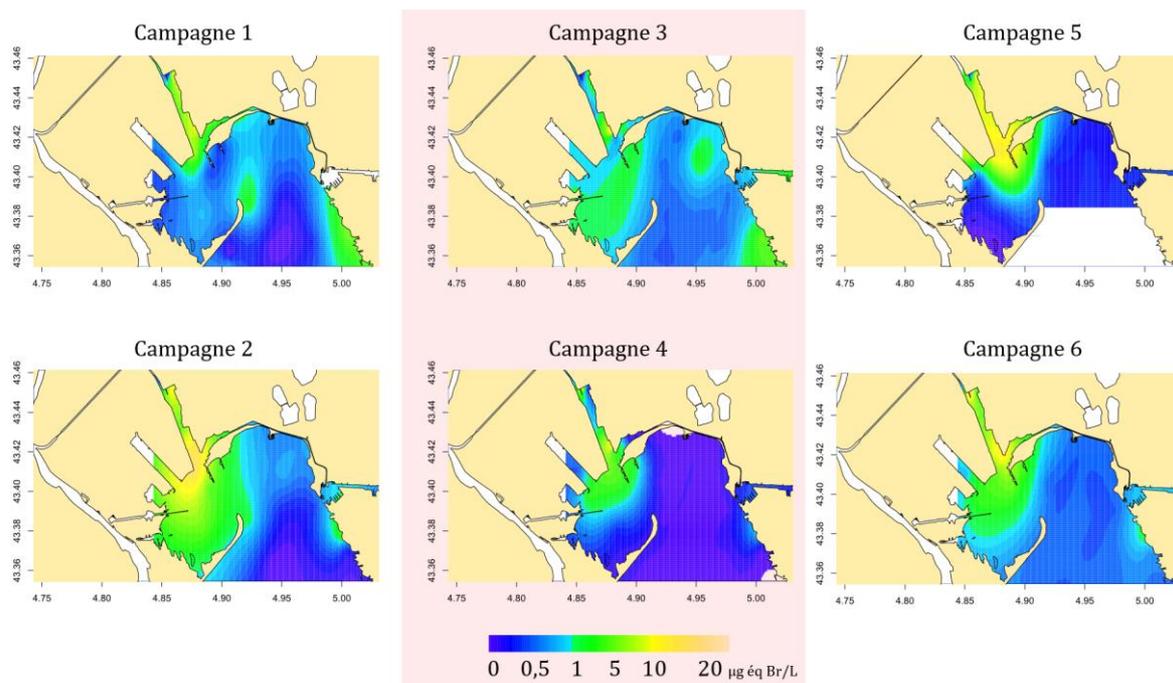


Figure 23: Interpolation spatiale de la distribution de la pollution en DBPs à la surface du golfe lors des 6 campagnes

La Figure 23 montre que même si les concentrations en mer sont semblables, campagne après campagne, lors de la seconde, sous un vent de mistral important qui a induit un courant marqué du nord au sud, la pollution rentre largement dans l'anse de Carteau, qui abrite le parc à moules du golfe. Il semblerait donc que pour les volumes d'eau chlorée équivalents, le facteur important à prendre en compte serait les conditions météorologiques, qui en fonction des courants peut concentrer la pollution dans les zones non désirées du golfe. Cela a également été montré par Ulses et al. (2005) qui ont étudié la courantologie du golfe de Fos.

3.2. Niveau de pollution dans les sédiments du golfe

Les halophénols sont les composés issus de la chloration de l'eau de mer les plus lipophiles ($K_{ow} = 4,13$). C'est donc cette famille de composés qui est recherchée dans les matrices solides. En effet, sur les 10 stations échantillonnées pour l'analyse des sédiments, deux halophénols ont été quantifiés, pour les stations 22m et 13x. À la station d'échantillonnage 22m, du 2-chloro-4-bromophénol et du 2,4,6-tribromophénol ont été détectés à 1,8 et 2,1 ng/g poids sec, respectivement. Et pour la station d'échantillonnage 13x, les deux HP ont été détectés à 0,3 et 1,5 ng/g de poids sec, respectivement. Les

données sur les concentrations d'halophénols dans les sédiments marins des zones exposées aux effluents chlorés sont très rares. Dans une étude précédente, Sim et al. (2009) ont étudié la présence et la distribution de phénols halogénés dans les sédiments obtenus dans un environnement marin près d'une centrale nucléaire en Corée du Sud. Selon les résultats de cette dernière étude, les bromophénols ont été trouvés à des concentrations plus élevées que les chlorophénols. La concentration moyenne rapportée de 2,4,6 tribromophénol a atteint 3,78 ng/g de poids sec au printemps.

Les points de prélèvement concernés par des sédiments contaminés en halophénols ne sont pas les plus proches des exutoires. En effet, le point 13x est l'exutoire industriel le plus excentré du golfe, dans aucune campagne les teneurs en DBPs ont dépassé la centaine de ng/L. A cet endroit du golfe, la concentration en HP dans l'eau a toujours été inférieure à la limite de détection. On peut penser que la présence chronique de DBPs dans le golfe et le potentiel de sorption et d'accumulation des halophénols dans les sédiments, peut conduire à des niveaux détectables et quantifiables. Cependant, la source de contamination en bromophénols ne peut pas être connue de façon certaine, étant donné qu'elle peut aussi être d'origine naturelle (OMS 2005) et que les points contaminés sont éloignés des exutoires. L'origine du 2,4,6-tribromophénol dans le milieu marin reste un sujet de controverse. Et pourtant, des effets nocifs importants sur les populations de poissons ont déjà été montrés (Deng et al. 2010).

3.3. Niveau de pollution des oursins du golfe

Les concentrations en 2,4,6-tribromophénol mesurées dans les gonades d'oursins sont comprises entre 62,11 et 205,31 µg/kg de poids sec (Tableau 8). Ces valeurs sont nettement supérieures à celles retrouvées dans la littérature, et notamment dans une étude précédente sur le golfe de Fos où les concentrations dans des muscles de congres étaient comprises entre 2,8 et 10,4 µg/kg (Boudjellaba et al. 2016). Les gonades d'oursin sont riches en matière grasse, +15% par rapport aux muscles de congres, ce qui favorise l'accumulation des polluants organiques. Aucune étude à ce jour n'a reporté un niveau de pollution en DBPs dans les gonades d'oursin. Chung et al. (2003), a étudié le niveau du tribromophénol dans des fruits de mer tels que des moules, des crevettes, des crabes et Whitfield et al. (1998), dans les muscles de mérour. Ces données sont résumées par Koch and Sures (2018). A l'exception des crabes où des concentrations en TBP peuvent

atteindre 2360 µg/kg de poids sec, toutes les autres espèces sont nettement moins riches que les oursins. Toutefois, de grandes variations existent au sein d'une même espèce et entre individu prélevés dans un même site géographique. Il est donc peu pertinent de comparer les niveaux retrouvés avec des études antérieures datant des années 2000.

Tableau 8 : Valeurs moyennes et écarts-types en µg/kg des concentrations dans les oursins pour chaque zone d'étude

	Moyennes des concentrations en 2,4,6-TBP (µg/kg)	Écarts-types des concentrations en 2,4,6-TBP (µg/kg)
Gloria	149,24	38,77
Eolienne	75,65	6,83
Cavaou	94,71	15,00
Fos-sur-Mer	104,41	18,05
Port-de-Bouc	36,98	20,79
Ponteau	106,81	20,91

Toujours est-il que lorsqu'on s'intéresse aux niveaux de pollution retrouvés dans les oursins en fonction de la zone de pêche (Figure 24), on ne distingue pas de corrélation liée à la zone géographique. En effet, les sites avec les niveaux de pollution les plus élevés sont Gloria suivi de Port de Bouc et Ponteau. Ce sont des sites latéralement opposés et à l'exception de Ponteau, ce ne sont pas des sites où des rejets chlorés sont observés. A Ponteau, qui correspond au point de prélèvement 13x, des concentrations très faibles en DBPs ont été mesurées lors des 6 campagnes, en revanche du tribromophénol a déjà été retrouvé dans les sédiments.

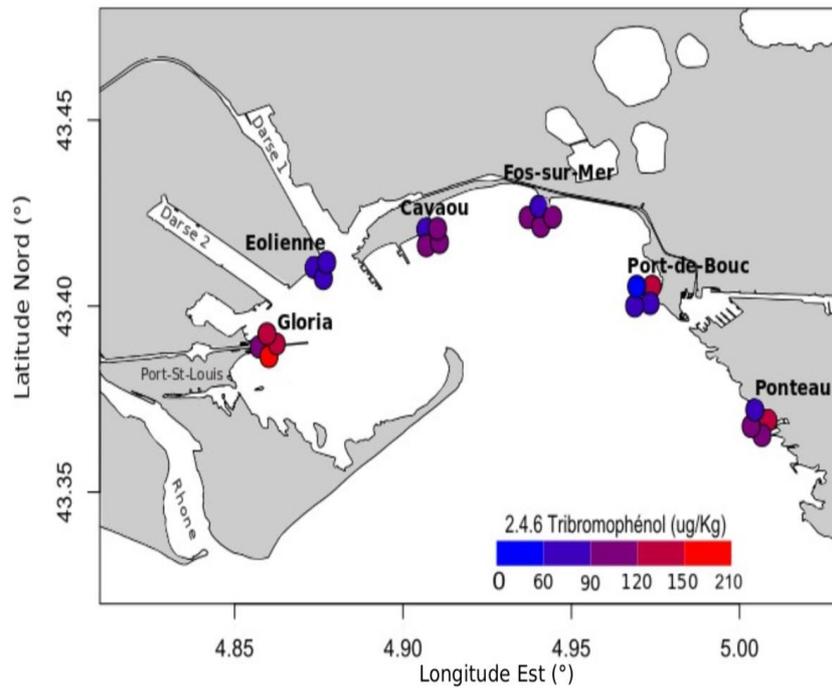


Figure 24 : Concentrations ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de poids sec) dans les oursins selon leur localisation dans le Golfe de Fos

Le site Gloria est proche du parc à moules du golfe, cette contamination maximale dans les gonades est très certainement liée à une production naturelle de tribromophénol, par les micro et macro-organismes abondants et concentrés dans cette zone du golfe. Comme nous l'avons vu lors de la campagne 2 et comme l'ont montré Ulses et al. (2005) la courantologie du golfe peut concentrer la pollution dans l'anse de Carteau lorsqu'un vent de nord souffle. Les pêches ont été réalisées en hiver 2017, avec une eau dans le golfe avoisinant les 9°C, on peut naturellement penser que le niveau de pollution sur cette période se rapproche de la campagne 3, c'est-à-dire peu d'influence industrielle dans la colonne d'eau du fait des faibles températures. Pour vérifier ces hypothèses, il faudrait analyser des gonades d'oursins issues de sites non soumis aux rejets chlorés, et dans l'idéal tester différentes saisons afin de vérifier une potentielle corrélation pollution des gonades/débit industriel/courantologie.

4. Conclusion

L'objectif de ce chapitre est d'établir un bilan de la contamination en sous-produits de chloration dans différents compartiments du golfe de Fos. Le compartiment le plus étudié est la colonne d'eau. A l'issue de 6 campagnes couvrant à chaque fois des conditions météorologiques différentes, la pollution en DBPs totaux du golfe ne dépasse pas la vingtaine de $\mu\text{g/L}$, et atteint la sortie du golfe à des concentrations inférieures à quelques ng/L . Il existe une large diversité de composés dosables malgré l'effet de dilution conséquent. Jusqu'à 15 composés différents ont été détectés au niveau des rejets chlorés en activité. Les niveaux de DBPs dans le golfe de Fos sont principalement dépendants des besoins en eau des industriels.

Les principales familles de DBPs retrouvées sont les trihalométhanes, les acides haloacétiques et haloacétamides. Deux nouveaux composés ont été mesurés pour la première fois dans le milieu marin, le tribromonitrométhane et le dibromiodométhane.

Nos analyses ont montré qu'il n'existait pas de différence significative entre les résultats obtenus en surface et en profondeur. En effet, il y a très peu de fond dans les darses, permettant une homogénéisation suffisante pour que la pollution soit semblable malgré des rejets industriels variés (débit, température).

Lors de l'analyse des sédiments, deux halophénols ont été détectés, le 2,4,6 tribromophénol et le 2-chloro-4-bromophénol, dans deux sites sur les 10 analysés. Les teneurs en HP retrouvés dans ces deux sites ne sont pas corrélées avec celles mesurées dans la colonne d'eau, milieu le plus riche en DBPs. Les cinétiques de formation des phénols encore mal comprises et les multiples sources possibles rendent l'interprétation des résultats délicate.

Au niveau de la faune et de l'influence de la zone géographique, il n'y a pas de tendance clairement établie. Malgré une homogénéité des teneurs en 2,4,6-TBP dans les gonades d'oursin selon leur site de prélèvement, la présence des concentrations élevées éloignées des exutoires reste à préciser. Selon la littérature, les oursins semblent avoir des teneurs importantes en 2,4,6 TBP par rapport à celles mesurées dans les muscles de poissons, ou dans les moules. Ces derniers sont des organismes filtreurs qui bioaccumulent les polluants (Wu et al. 2012; Jimeno-Romero et al. 2019).

Dans le chapitre suivant nous nous sommes intéressés à l'impact de cette pollution.

CHAPITRE 3 : Impact des sous-produits de chloration

Ce chapitre vise à caractériser l'impact de la pollution aux DBPs retrouvés dans le golfe de Fos. Deux modèles biologiques différents sont étudiés, le phytoplancton et les oursins. La répartition en fonction des sites du golfe de différents groupes de phytoplancton est étudiée afin de voir si une pression exercée par les exutoires chlorés est qualifiable. C'est donc un impact direct in-vivo qui est recherché. Parallèlement une étude d'impact a été réalisée sur des larves d'oursin issues du golfe, cette fois ci in-vitro afin d'étudier et caractériser les différents paramètres fondamentaux de toxicité, comme la concentration maximale n'induisant pas d'effet (NOEC), la concentration effective induisant 50% d'effet (EC₅₀) et 90% d'effet (EC₉₀).

1. Introduction

Une fois l'occurrence dans le golfe connue, cette partie se consacre à la caractérisation de l'impact des principaux sous-produits de chloration. Le bromoforme (trihalométhane) et l'acide tribromoacétique (acide haloacétique) sont parmi les molécules les plus répandues dans le golfe ; le 2,4,6 tribromophénol (halophénol) est quant à lui la seule molécule retrouvée dans les sédiments et les organismes marins. La plupart des DBPs testés jusqu'à présent se sont révélés toxiques et génotoxiques pour divers organismes modèles, comme des bactéries, des cellules de mammifères ou les embryons de poissons zèbres (Antonelli et al. 2009; Wagner and Plewa 2017; Hanigan et al. 2017; Domínguez Henao et al. 2018). De plus, les DBPs bromés sont plus toxiques que leurs analogues chlorés (Richardson et al. 2007, 2010; Yang and Zhang 2013; Hanigan et al. 2017). Il est à noter que les effets néfastes visibles ont toujours été observés après une exposition (jusqu'à 3 jours) à des concentrations élevées de DBPs (mg/L), ce qui suggère que les risques toxiques et génotoxiques sont limités dans l'environnement (Teixidó et al. 2015). Néanmoins, des recherches épidémiologiques récentes ont suggéré que l'exposition à vie aux DBPs, principalement par ingestion, augmenterait considérablement le risque de cancer de la vessie chez l'Homme (Villanueva et al. 2004, 2006).

Les études qui évaluent cette toxicité chez les animaux aquatiques demeurent rares et, à notre connaissance, seulement deux études ont été réalisées ces dernières années à l'aide du modèle embryonnaire de poisson zèbre (Teixidó et al. 2015; Hanigan et al. 2017). Ces deux études ont porté sur un total de 11 DBPs bromés, dont le bromoforme (BMF) et l'acide tribromoacétique (TBAA). La plupart des DBPs bromés se sont révélés toxiques pour le développement larvaire, mais seulement à des concentrations élevées (c.-à-d. > 100 μ M). De plus, l'exposition à court terme aux eaux usées chlorées n'a pas eu d'effet toxique significatif. Enfin, un effet génotoxique a été détecté qu'avec le chlorodibromométhane et le borate de sodium à leurs niveaux EC_{50} , 160 μ M et 0,049 μ M, respectivement, basés sur des anomalies de croissance.

Dans cette partie, nous voulions mieux comprendre l'impact toxicologique des DBPs sur les organismes marins côtiers en utilisant la diversité planctonique du golfe et les premiers stades larvaires de l'oursin *Paracentrotus lividus*. L'oursin est un organisme modèle pertinent pour évaluer l'effet de molécules potentiellement nocives en laboratoire. La reproduction s'effectue facilement in vitro, et permet d'obtenir un

nombre élevé de larves translucides, bien visibles en microscopie photonique. Les larves d'oursins ont été largement utilisées pour évaluer la toxicité embryonnaire et la génotoxicité des molécules (Hose 1985; McGibbon and Moldan 1986; Morroni et al. 2016; Gharred et al. 2016). Concernant le phytoplancton, il constitue cette part invisible mais si dense des océans. Le picoplancton représente la majeure partie de la biomasse et de la productivité primaire du plancton marin (Grossman et al. 2010; Buitenhuis et al. 2012; Liang et al. 2017).

Le picoplancton regroupant les organismes d'une taille comprise entre 0,2 μm et 2 μm , utilise comme ressources la lumière et les minéraux, il est responsable de plus de 45% de la production primaire à l'échelle mondiale (Field et al. 1998). Ce groupe est constitué essentiellement d'organismes unicellulaires procaryotes ou eucaryotes qui sont la base, de toute la chaîne alimentaire, des cycles biogéochimiques et de la richesse génétique des océans (Whitfield et al. 1998). Leur diversité et la composition des communautés reposent sur un équilibre fragile pouvant être perturbé par le moindre changement de leur environnement, climatique, ou par une pollution anthropique. Quelques études ont montré l'impact de polluants organiques (González et al. 2009; Kottuparambil and Agusti 2018) ou métalliques (Caroppo et al. 2006; Coclet et al. 2018) sur les communautés naturelles et ont montré que, quel que soit le site pollué, la structuration des communautés planctoniques est toujours affectée.

Dans cette étude, notre premier objectif est d'évaluer l'influence des rejets constatés dans le golfe sur la distribution et la structure planctonique et de générer pour un organisme marin modèle des données supplémentaires sur l'influence toxique de trois contaminants bromés majeurs présents dans l'eau de mer côtière qui est soumise à des perturbations anthropiques massives.

2. Mise en pratique

2.1. Prélèvement et quantification des communautés planctoniques

Les échantillons d'eau ont été prélevés lors des six campagnes « eau », à chaque station décrite dans le Chapitre 2. Pour éliminer les particules susceptibles de perturber l'analyse chaque prélèvement a été filtré à 40 μm , et conservé dans 0,25% de glutaraldéhyde à -20°C jusqu'à analyse afin de préserver l'intégrité cellulaire et les pigments de chaque organisme. Ils ont ensuite été analysés à l'aide d'un cytomètre en flux Accuri C6 (BD Biosciences). Un volume de 250 μL à 500 μL a été analysé pour dénombrer les différents organismes phytoplanctoniques de l'échantillon.

La cytométrie est une technique permettant de différencier et de dénombrer les organismes en suspension dans un liquide en fonction de la taille et la complexité de leur cellule ainsi que de leur fluorescence (Sieracki et al. 2019). La diffusion aux grands angles (ou Side Scatter, SSC) et aux petits angles (ou Forward Scatter, FSC) est respectivement proportionnelle à la complexité des particules et à leur taille. Le laser standard pour la mesure de ces paramètres est de longueur d'onde bleue (488 nm). Des capteurs de fluorescence verte, orange et rouge sont ensuite utilisés pour différencier et regrouper les cellules sur la base de leur fluorescence naturelle ou induite par ajout d'un fluorochrome. Dans le picoplancton on retrouve principalement des procaryotes hétérotrophes, des picoeucaryotes photosynthétiques et des cyanobactéries, ils représentent à eux seuls 80 à 90% de la biomasse marine. *Synechococcus* est le genre de cyanobactérie dominant en zone côtière et a été identifié grâce à sa fluorescence forte en orange et faible en rouge ainsi que par sa petite taille et sa faible complexité. Les picoeucaryotes ont été caractérisés grâce à leur forte fluorescence en rouge et faible en orange, ainsi qu'à leur plus grande taille et complexité. Pour l'analyse des procaryotes hétérotrophes, qui sont des organismes non fluorescents naturellement, les échantillons ont été dilués au demi ou au tiers (selon la concentration en microorganismes dans les échantillons) avec une solution autoclavée et filtrée sur 0,2 μm de NaCl 38 g/L. Ils ont ensuite été incubés 10 min à l'obscurité avec du Sybergreen 1X (concentration finale), puis un volume de 50 μL a été analysé. Ils ont été identifiés grâce à leur fluorescence verte, leur petite taille et leur faible complexité.

L'abondance des procaryotes hétérotrophes ainsi obtenue a été convertie en biomasse carbonée à l'aide de facteurs de conversion issus de la littérature (valeur moyenne de 20 fg de carbone par cellule, (Pedler et al. 2014)). De même l'abondance des *Synechococcus* a été convertie en biomasse carbonée sur la base d'un facteur de conversion moyen (Lagaria et al. 2017). Concernant les eucaryotes photosynthétiques, la taille moyenne des cellules a été utilisée pour calculer un biovolume en considérant leur forme géométrique sphérique, puis une masse moyenne de carbone par unité de volume précédemment publiée (Lagaria et al. 2017) a été utilisée pour calculer la biomasse carbonée de ce groupe. Les différentes biomasses carbonées ainsi obtenues ont été normalisées (division par la moyenne) afin de s'affranchir des différences d'ordre de grandeur entre groupes.

2.2. Production de larves d'oursin et conception expérimentale

Pour le second axe de ce chapitre, nous avons utilisé des embryons d'oursins pour évaluer la toxicité et le potentiel génotoxique du bromoforme, de l'acide tribromoacétique et du tribromophénol, testés seuls ou en cocktail, sur deux populations de *P. lividus*, exposées de façon chronique (ceux du golfe de Fos, site pollué PS) ou non exposées (oursins venant d'un site non pollué aux organohalogénés de la côte Varoise, site non pollué, NPS).

Les premiers stades de développement, embryonnaires et larvaires de l'oursin sont très souvent utilisés pour analyser les effets d'une grande diversité de composés chimiques, comme des substances inorganiques, des matières organiques et des mélanges complexes, comme des effluents industriels. Le modèle oursin a ainsi permis de mieux comprendre les mécanismes de toxicité de nombreuses substances (par exemple les xénobiotiques).

Plusieurs paramètres caractérisant un effet toxique peuvent être suivis, comme le succès de fécondation, le taux d'anomalie du développement, l'équilibre redox, les dommages à l'ADN, l'expression de gènes (Stumpp et al. 2011; Evans and Watson-Wynn 2014; Migliaccio et al. 2015; Pagano et al. 2017). Ainsi, ces expériences peuvent fournir des informations variées sur la capacité d'un xénobiotique à interférer avec les phases clés des premiers stades de la vie des embryons et larves, comme la division et la

différenciation cellulaire, la fertilisation et le stress oxydatif (Korkina et al. 2000; Pagano et al. 2001; Romano et al. 2011; Migliaccio et al. 2014).

Pour ce faire, des oursins adultes *Paracentrotus lividus* ont été récoltés en apnée, pendant la période légale de récolte, le matin de chaque expérience, dans un site témoin près de la baie de Toulon (Var, France) (Baie de Garonne, coordonnées : 43.098503N-6.018430E), où aucune pollution chlorée n'a été détectable, et dans le golfe de Fos. La ponte des adultes a été induite par de légères secousses. Les spermatozoïdes ont été prélevés à l'aide d'une micropipette et conservés dans un tube stérile, sur la glace. Les ovocytes ont été collectés dans 100 ml d'eau de mer filtrée et observés au microscope pour vérifier leur maturité. Les ovocytes et les spermatozoïdes d'un couple ont été mélangés dans 50 ml d'eau de mer et incubés à 20°C, sous agitation pendant 45 minutes, puis les taux de fécondation ont été évalués. Pour chaque test de toxicité, dix expériences indépendantes (couple différent) ont été menées en triplicat, sur des populations larvaires que l'on a supposées non apparentées.

2.2.1. Produits chimiques

Des solutions mères de bromoforme (CAS 75-25-2, Sigma-Aldrich) et d'acide tribromoacétique (CAS 75-96-7, Sigma-Aldrich) ont été préparées par dissolution directe dans l'eau de mer. Le tribromophénol (CAS 118-79-16, Sigma-Aldrich) a d'abord été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour compenser sa très faible solubilité dans l'eau, puis dilué dans l'eau de mer, avec une concentration finale de DMSO de 0,1%.

2.2.2. Evaluations toxicologiques

Dans des microplaques de 24 puits, des suspensions d'environ 500 œufs fécondés dans 2 mL de FSW ont été exposées pendant 48 heures à 7 concentrations de chaque produit chimique. A la fin du temps d'exposition, les larves ont été fixées par addition d'éthanol à 15% en concentration finale et maintenues à 4 °C jusqu'à ce que des observations microscopiques soient effectuées. Les larves *Pluteus* ont été comptées selon deux critères : « normales » et « anormales » (c.-à-d. croissance retardée, anomalies du développement, mort). Nous avons ensuite déterminé les courbes dose-réponse à l'aide du package « drc » du logiciel R et déduit la concentration induisant 50% d'effet, EC₅₀, considérée ici comme la concentration de la substance chimique à laquelle nous ne pouvions observer que 50% de larves normales et viables. Les concentrations efficaces les plus faibles et nulles observées (respectivement NOEC = no observed effect

concentration et LOEC = lowest observed effect concentration) ont été déduites des concentrations chimiques utilisées dans les expériences. Nous avons ensuite évalué la toxicité de nos trois molécules en cocktail. Les mélanges contenaient chaque produit chimique soit à leur NOEC respective, soit à leur LOEC respective.

2.2.3. Détermination du stress oxydant

Dans les cellules, il existe toujours des espèces moléculaires oxydantes, en particulier des espèces réactives de l'oxygène (ROS), certaines étant radicalaires. Ce sont des molécules très réactives, avec un potentiel oxydant élevé, qui ont la propriété d'attaquer et altérer les composants moléculaires de la cellule. Cette réactivité s'explique grâce à leur structure électronique. En effet, ces molécules possèdent sur leur couche externe un ou plusieurs électrons et pour devenir plus stables vont devoir compléter leur couche en arrachant des électrons à d'autres molécules adjacentes. La présence de ROS est normale, liée à la respiration cellulaire, et certaines espèces radicalaires sont même impliquées dans certaines voies de signalisation cellulaire (par exemple NO°). Les ROS peuvent aussi être générés suite à l'exposition des cellules à des composés chimiques, tels que des métaux lourds ou certaines molécules organiques xénobiotiques qui vont activer les voies de détoxification cellulaires induisant de façon indirecte la production de ROS. Un excès de ROS dans une cellule est délétère, car ils induisent des cassures moléculaires importantes, impactant l'intégrité des membranes, des protéines et de l'ADN. Aussi, l'évolution a sélectionné des systèmes antioxydants principalement des enzymes, qui permettent aux cellules de maintenir les ROS à des concentrations physiologiques. Le stress oxydant correspond à un déséquilibre des voies de signalisation et de contrôle du statut redox de la cellule.

Les radicaux libres, du fait de leur brève durée de vie mais aussi de leur haute réactivité, sont difficiles à mettre en évidence. Généralement, ce sont les marqueurs de l'agression radicalaire au niveau de l'ADN, des protéines et surtout des lipides, qui permettent, de façon indirecte, d'évaluer le stress oxydant.

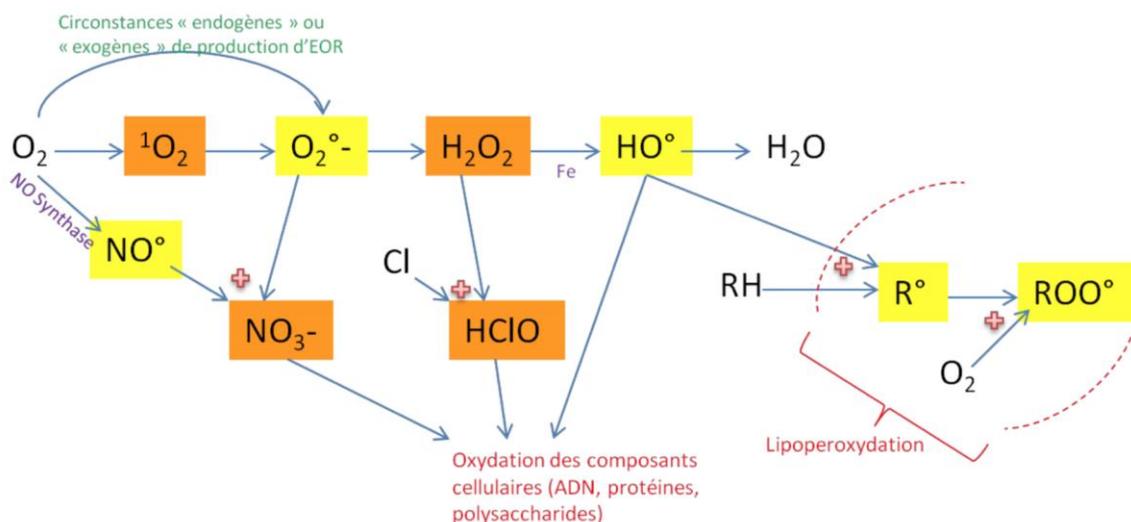


Figure 25 : Cascade de production des principales espèces réactives de l'oxygène, selon Favier (1997)

Ainsi, afin de caractériser le type et le niveau de stress oxydant induit par les DBPs testés, nous avons choisi de mesurer les concentrations d'oxyde nitrique, de caractériser la peroxydation lipidique et d'évaluer la capacité antioxydante.

- L'oxyde nitrique (NO)

L'oxyde nitrique est un gaz qui, par conséquent, diffuse à travers les membranes biologiques. Il est synthétisé par l'oxyde nitrique synthase (NOS), à partir de l'oxygène et d'un acide aminé, la L-Arginine. Mandelker (2008), assure qu'il n'est néfaste pour l'organisme qu'à de fortes concentrations car il génère alors trop de peroxynitrite NO_3^- (Figure 25). L'oxyde nitrique notamment intervient comme médiateur dans les événements apoptotiques. À de plus faibles concentrations, l'oxyde nitrique contribue à l'activation de l'expression du gène hsp70, protégeant ainsi les embryons contre les effets toxiques de cet aldéhyde (Romano et al. 2011).

Les niveaux endogènes de NO ont été mesurés en surveillant la formation de nitrites par réaction de Griess (Migliaccio et al. 2014). Le système de réactifs Griess est basé sur la réaction chimique illustrée à la Figure 26, qui utilise de la sulfanilamide et du chlorhydrate de N-1-naphtyléthylènediamine (NED) sous conditions acides (acide phosphorique).

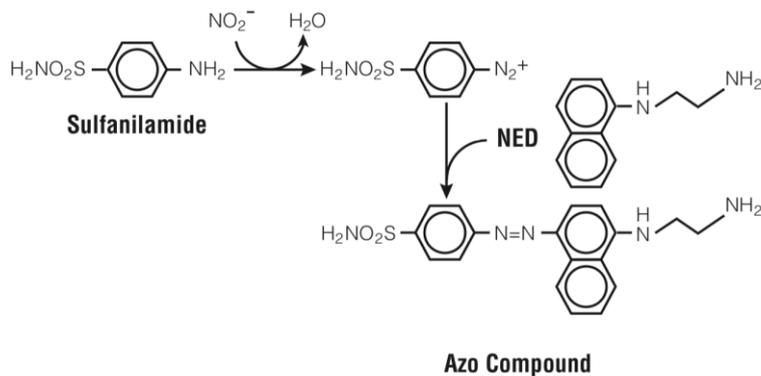


Figure 26 : Réactions chimiques impliquées dans la mesure du NO_2^- à l'aide du système de réactifs de Griess

Des larves d'oursins en développement (environ 15 000) ont été collectées au stade *Pluteus* après 48 heures d'exposition aux différentes LOECs, par centrifugation à 1800 g pendant 10 minutes dans un rotor pivotant, à 4 °C. Les culots ont été lavés avec du PBS à 4 °C, puis congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80 °C jusqu'à leur utilisation. Les échantillons ont été repris dans du PBS (1:2 p/v), centrifugés (12 000 g pendant 30 minutes à 4 °C) et les teneurs en peroxydite des surnageants ont été déterminées (Migliaccio et al. 2014).

- Péroxydation lipidique

L'oxydation des lipides comprend deux étapes, la première correspond à la perte d'un atome d'hydrogène causée par un radical hydroxyle et la seconde à la liaison avec une molécule d'oxygène (McMichael 2007; Powers and Jackson 2008). Le dialdéhyde malonique (MDA) est issu de l'action des ROS sur les acides gras polyinsaturés. Il constitue donc un marqueur du phénomène de lipopéroxydation. En outre, il peut former des adduits à l'ADN mutagènes en réagissant avec la désoxyadénosine et la désoxyguanosine.

Actuellement, beaucoup de méthodes *in vivo* et *in vitro*, sont exploitées pour déterminer la quantité de MDA formée par peroxydation lipidique. La plus courante reste celle basée sur les mesures spectrophotométriques ou spectrofluorimétriques du complexe MDA-acide thiobarbiturique (MDA-TBA).

Environ 15000 embryons d'oursin en développement ont été collectés au stade *Pluteus* après 48 heures d'exposition aux différentes LOECs, par centrifugation à 1800g pendant 10 minutes à 4°C. Les culots ont été homogénéisés dans du Tris-HCl contenant 0,1 mM d'EDTA et 0,2 % de triton X-100 (1:2 W/ V) et centrifugés (à 14 000g pendant 30 minutes, 4 °C). Le surnageant (200 µl) a été ajouté à 1 ml du tampon de réaction

contenant 15% d'acide trichloroacétique (TCA), 0,375% de TBA et 0,1% de butylhydroxytoluène (BHT). Le tampon a été préparé en ajoutant du TBA (préalablement dissous dans 1-2 ml de HCl 12 M) à la solution de TCA en agitant sur une plaque chauffante. Après incubation à 95 °C pendant 15 minutes, le mélange réactionnel a été centrifugé et son absorbance a été mesurée. Une courbe standard pour le MDA a été préparée à l'aide de 1,3-tétraéthoxypropane tel que rapporté par (Esterbauer et al. 1991). Deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) se combinent, en milieu trichloroacétique et à chaud (100°C) au MDA, pour former un complexe dissous coloré rose. L'intensité du complexe coloré est mesurée au spectrophotomètre à 532 nm (Ohkawa et al. 1979).

- Les antioxydants

Le suivi de l'évolution de la concentration en antioxydants permet de suivre l'installation d'un stress oxydant, consommateur de réserves antioxydantes et activateur des défenses de nature enzymatique (McMichael 2007). Les antioxydants que l'on peut doser sont nombreux ; les plus couramment dosés sont l'α-tocophérol, l'ascorbate et les enzymes SOD, GPX, et CAT. Les fluctuations mesurées d'un seul antioxydant sont délicates à interpréter dans la mesure où les antioxydants interagissent dans leur mode d'action. Une méthode de dosage plus globale a été mise au point et prend en compte les antioxydants totaux, aussi appelé TAC (Total Antioxidant Capacity). Le but n'est plus de doser un seul antioxydant, mais de fournir une indication sur la protection antioxydante globale (Prior and Cao 1999). Pour cela, diverses techniques existent (Prior and Cao 1999), mais le principe reste toujours le même (Urso and Clarkson 2003): on expose l'organisme à une ROS qui va réagir avec les défenses antioxydantes de l'organisme, ce qui permet de déduire les concentrations initiales par comparaison avec un témoin non exposé aux ROS.

En réagissant avec le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique)) forme le radical $ABTS^+$, de couleur bleue à verte. L'ajout d'antioxydants va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange. La décoloration du radical mesurée par spectrophotométrie à 490nm est proportionnelle à la concentration en antioxydants. Nous avons utilisé le kit OxiSelect Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC).

2.2.4. Test de génotoxicité

La génotoxicité du cocktail de molécules a été évaluée avec le test des comètes, selon la méthode de (Tice et al. 2000b). Environ 5000 larves âgées de 48 heures ont été exposées comme décrit ci-dessus (page 65), pendant 1 heure. Après exposition, les larves ont été collectées par centrifugation à 1500g pendant 10 minutes, à 4°C. Le culot a été remis en suspension dans 1 mL d'eau de mer filtrée, puis mélangé délicatement avec 1 mL de glycine 1M et incubé sur la glace pendant 5 minutes, pour permettre la dissociation complète des cellules. Environ 50 000 cellules ont ensuite été collectées et placées dans 1mL de PBS 1X et centrifugées à 3000g pendant 5 minutes, à 4 °C. Les cellules ont ensuite été prélevées et délicatement mélangées à 50 µL d'agarose liquide à bas point de fusion (37 °C), puis étalées sur une lame de microscope (Tice et al. 2000).

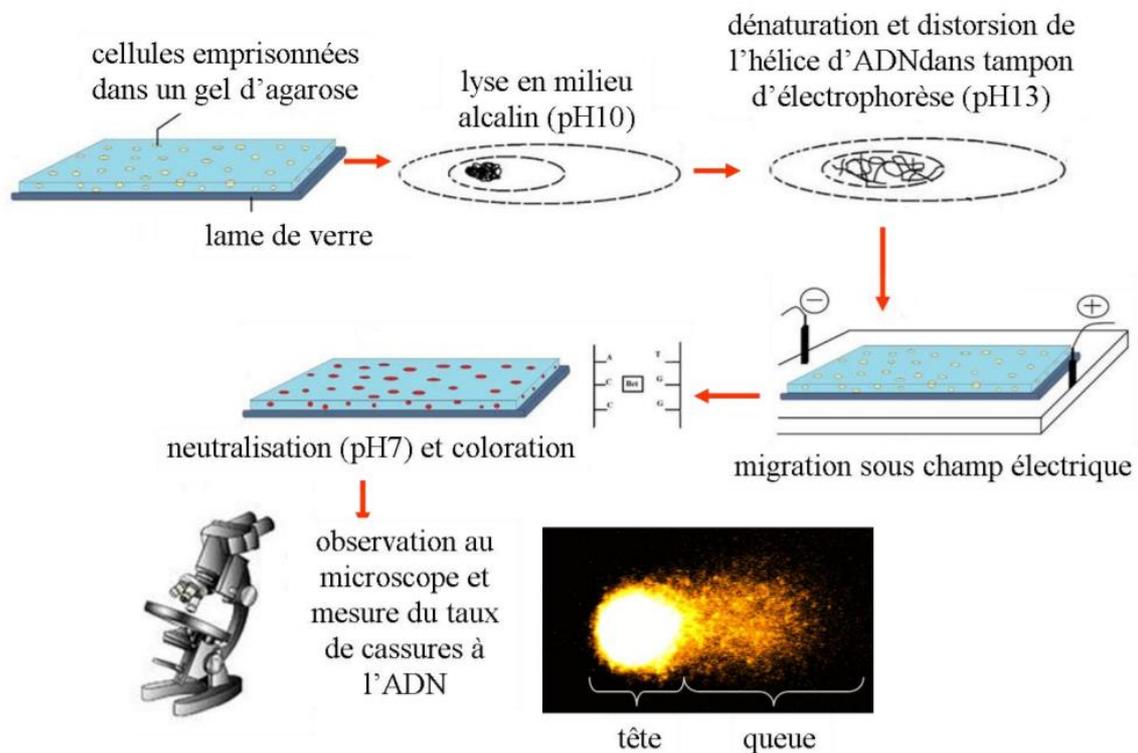


Figure 27: Principe du traitement des lames pour le test des comètes

Une fois préparées, les lames ont été immergées dans un tampon de lyse (2,5M NaCl, 100mM Na₂EDTA, 2H₂O, 10mM Tris pH10, 10g N-Lauroylsarcosine, 10% DMSO et 1% Triton X100) pendant 90 minutes à 4 °C. Les lames ont ensuite été placées dans une cuve d'électrophorèse contenant une solution alcaline (200 mM Na₂EDTA 2H₂O, 10N NaOH)

pendant 20 minutes à température ambiante, pour permettre la dénaturation de l'ADN, puis l'électrophorèse a été réalisée pendant 20 minutes à 25V et 350mA. Par la suite, les lames ont été plongées dans un tampon de neutralisation (0,4M Tris-HCl pH 7,5) pendant 20 minutes (Figure 27). Enfin, les lames ont été fixées avec du méthanol à 100 % et séchées à température ambiante pendant la nuit. L'ADN a été coloré avec une solution de SyberGreen (Sigma-Aldrich) déposée sur chaque lame et laissé au repos pendant 20 minutes dans le noir. Les lames ont ensuite été lues à l'aide d'un microscope à épifluorescence équipé d'une caméra numérique et d'un logiciel d'acquisition d'images. Des cellules entières et des comètes observées dans plusieurs champs microscopiques choisis au hasard ont été capturées, indépendamment de la longueur et de la forme de la comète (Gyori et al. 2014). Les images ont ensuite été analysées à l'aide de l'application Open Comet v1.3.1 (cometbio.org) implémenté dans le programme ImageJ (SciJava) (Gyori et al. 2014).

Les dommages à l'ADN ont été évalués par la détermination du moment de la queue (Tail moment) décrit par Olive et al. 1993 (OTM), qui tient compte à la fois de la longueur et de la distribution de l'ADN dans la queue de la comète (Olive et al. 1991)(Figure 28) ainsi que par le % d'ADN dans la queue.

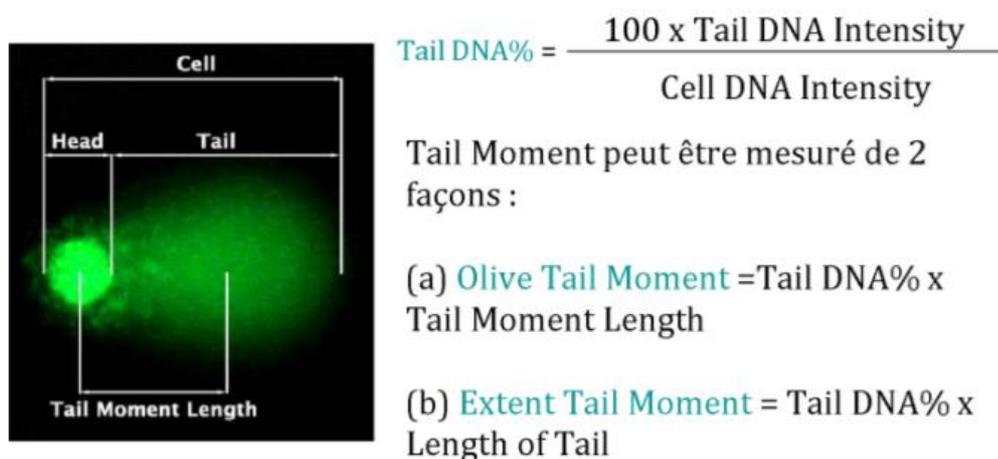


Figure 28: Principe d'évaluation de la comète

L'expérience témoin consistait à exposer des larves de 48h à de l'eau oxygénée (700µM). Cette concentration a été choisie après une expérience préliminaire au cours de laquelle

nous avons testé la génotoxicité de H₂O₂ pour une gamme de concentrations (R = 0,9983), comme décrit précédemment (Nahon et al. 2008).

2.3. Analyses statistiques

Les statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (version 3.6.1, 2019) et XLSTAT (Addinsoft, 2017). Pour étudier les relations entre les communautés planctoniques et les paramètres environnementaux diverses, une analyse de redondance (RDA) du package vegan a été entreprise. Des corrélations entre chaque paramètre biologique et chaque variable abiotique ont été réalisées par des tests de Spearman.

Des courbes dose-réponse ont été produites à l'aide de modèles de régression. Les concentrations efficaces (c.-à-d. EC₁₀, EC₅₀ et EC₉₀) ont été générées à l'aide de « l'estimation des doses efficaces » (ED.drc) du package R. Avant le test Kruskal-Wallis, qui permet la comparaison d'échantillons indépendants, les données écotoxicologiques et les données d'essai des comètes ont été testées pour vérifier leur normalité. Le test de Mann-Whitney a été réalisé pour comparer les données du site non pollué (NPS) au site pollué (le golfe de Fos). Les différences entre chaque condition étaient considérées comme significatives lorsque la valeur $p < 0,05$. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M.

3. Résultats

3.1. Evaluation de l'impact in vivo des rejets chlorés industriels sur les communautés picoplanctoniques locales.

L'analyse de redondance permet de regrouper différents groupes de variables explicatives, ici 3, qui influencent la répartition biologique.

- Les « nutriments » : azote total, nitrate, phosphate, ammonium et carbone organique dissous (COD)
- Les paramètres « physico-chimiques » de la sonde CTD : salinité, température, pH et oxygène dissous
- Les « DBPs » : composés organohalogénés totaux mesurés en GC-ECD

Pour chaque groupe, une ou plusieurs variables représentatives ont été choisies afin d'éliminer les colinéarités et augmenter la significativité du modèle. Ainsi 5 variables ont

été retenues, la salinité (SAL), la température (TEMP), le carbone organique dissous (COD), le phosphate (PO₄) et les composés organohalogénés (somme des concentrations mesurées en GC-ECD ramenées en µg/L équivalent Br, appelés « Halogènes »).

Les résultats issus de l'analyse de redondance ont été représentés graphiquement (Figure 29). Sur cette figure, l'axe 1 explique 46,9% des variations biologiques et est majoritairement représenté par les paramètres physico-chimiques. Le carbone organique dissous représente la plus forte contribution à l'axe 2 et explique 34,9% des variations biologiques. Aucun axe n'est expliqué significativement par les composés organohalogénés. En moyenne, avec tous les paramètres pris en compte, la RDA explique 50% de la variation biologique.

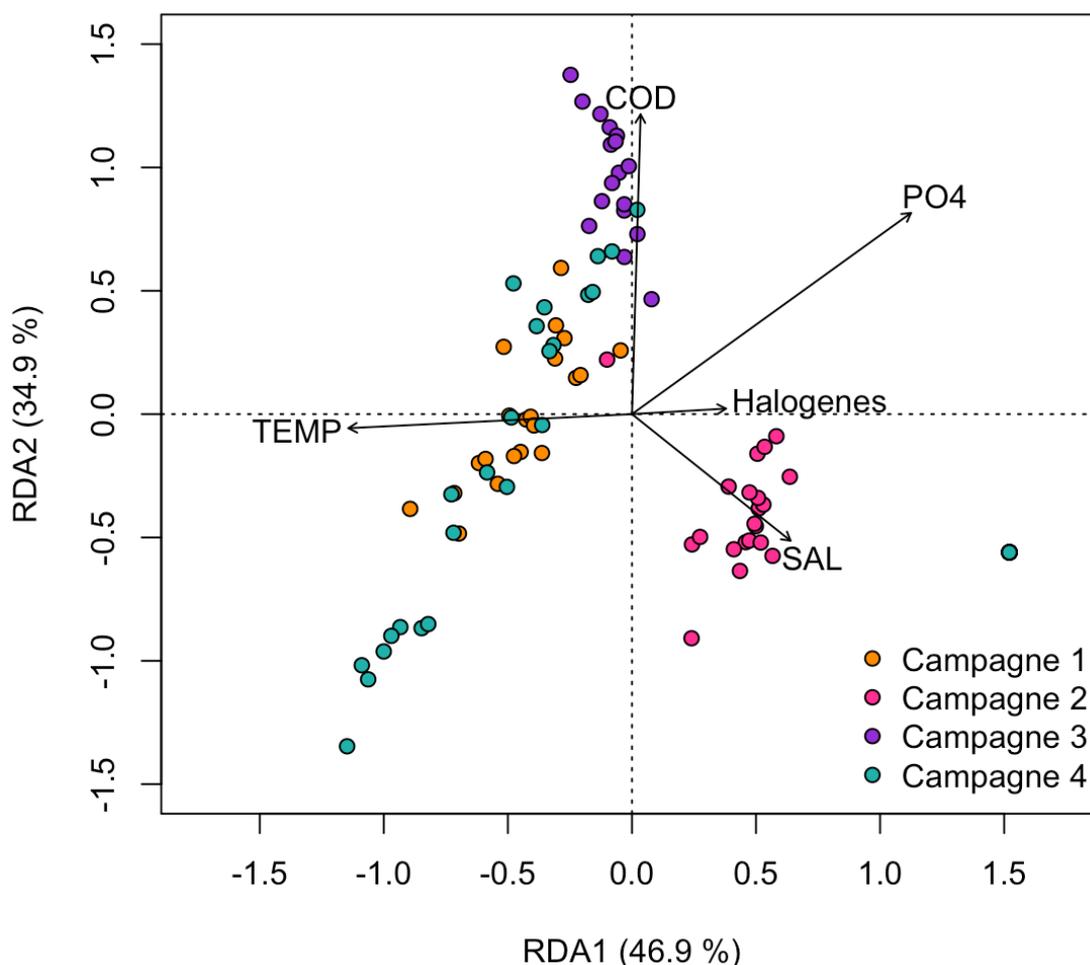


Figure 29: Représentation graphique de l'analyse de redondance des variables abiotiques expliquant la distribution des données biologiques.

Les campagnes sont différenciées par couleur et les variables les plus significatives pour le modèle sont représentées (pvalue < 0,05 ***).

La variation biologique des campagnes 1-3 et 4 semble principalement s'expliquer par la température et le carbone organique dissous. En revanche, la campagne 2 a une signature différente, elle semble davantage liée aux paramètres physico-chimiques et à la pollution. La contribution des DBPs à l'axe 1 reste cependant minime (Figure 29).

Le diagramme de Venn représenté sur la Figure 30, permet de voir la contribution de chaque groupe. Les données de la sonde CTD expliquent principalement les variations inter-campagnes.

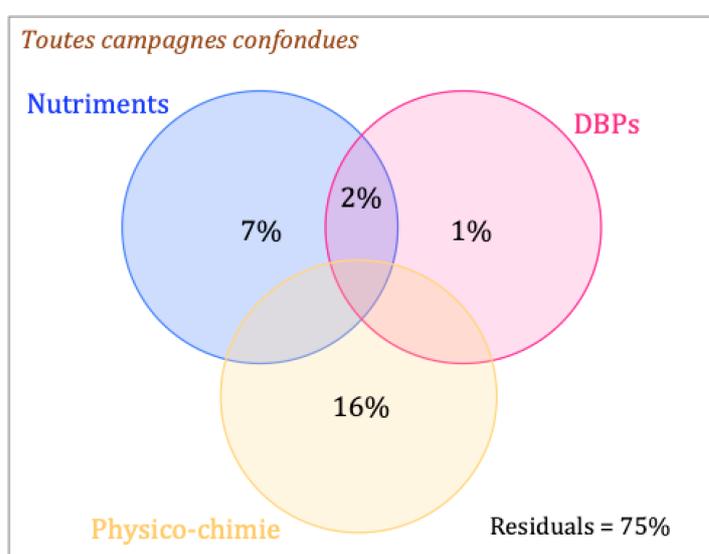


Figure 30 : Contribution de chaque groupe à la variabilité biologique, toutes campagnes confondues.

Avec en bleu les nutriments : PO₄, NO₃, NT, COD ; en rose les DBPs : composés organohalogénés totaux ; et en jaune les paramètres physico-chimiques : température, salinité, oxygène dissous, pH

La Figure 31 détaille les RDA obtenues pour chaque campagne individuellement. Brièvement, lors des campagnes 1, 3 et 4 il n'y a pas de réponse différente selon les sites, en effet tous les points sont mélangés. Il n'y a que lors de la deuxième campagne qu'on voit une sensible distinction. Les points en rouge, représentant les points proches des exutoires semblent être davantage corrélés aux DBPs mais aussi aux variations physico-chimiques. Si on se rapporte au diagramme de Venn de cette campagne, 35% des variations sont expliqués par la sonde CTD, et moins de 10% par les polluants

chimiques. Cependant, parmi ces groupes, on ne peut discriminer le paramètre le plus influent sur la variation biologique.

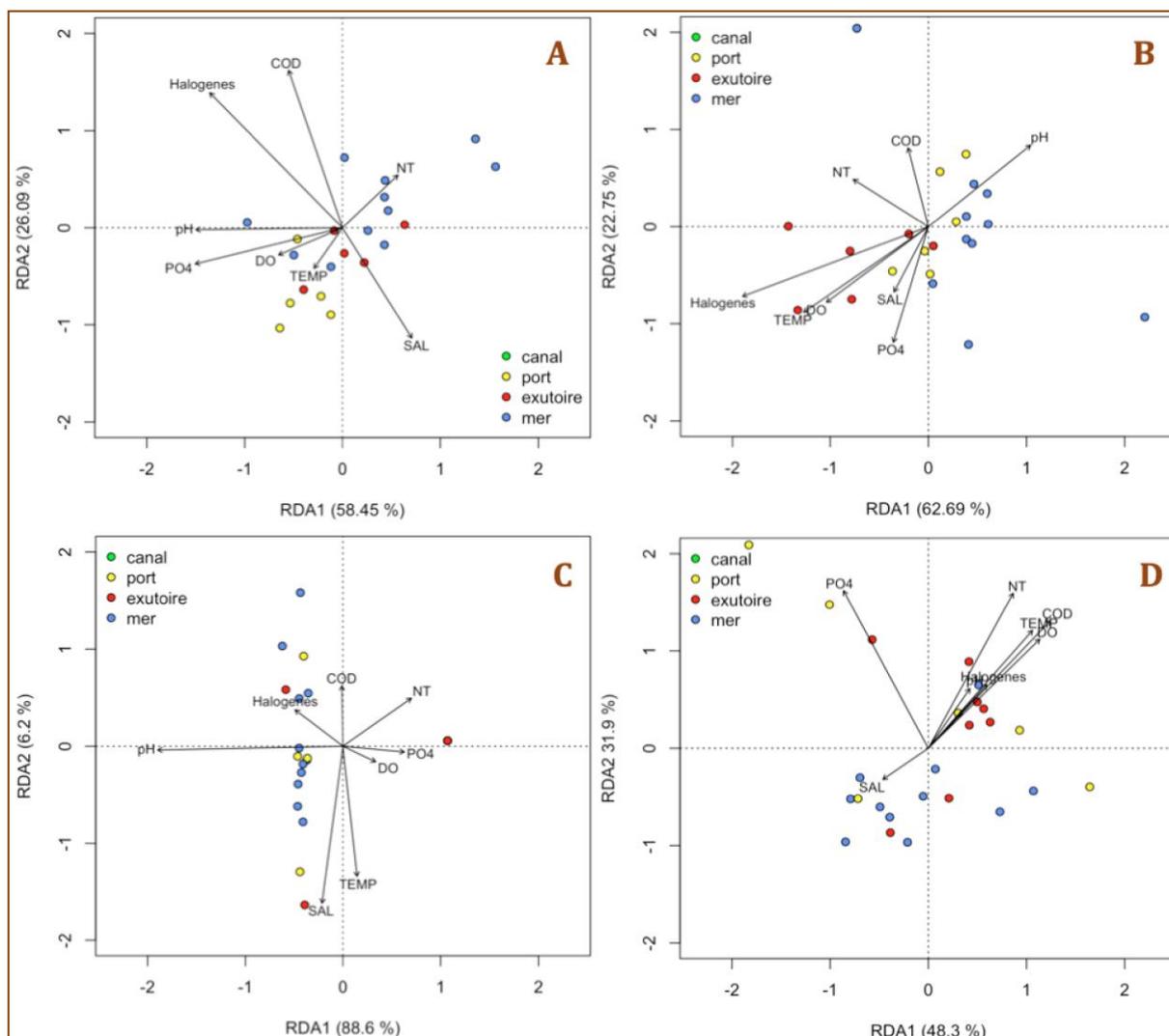


Figure 31 : Représentation des analyses de redondance pour chaque campagne, différenciant les sites de prélèvement.

A : campagne n°1 ; B : campagne n°2 ; C : campagne n°3 ; D : campagne n°4.

La distribution des groupes picoplanctoniques du Golfe de Fos est majoritairement expliquée par les ressources et les paramètres physico-chimiques du milieu.

En effet, les industries peuvent rejeter de l'eau de mer chlorée avec un delta de température par rapport à l'eau initialement pompée de $\pm 5^{\circ}\text{C}$. C'est très certainement ce delta qui influence prioritairement l'équilibre des communautés planctoniques. Pour toutes les autres campagnes, les DBPs ont très peu d'influence sur la variabilité biologique. On voit bien lors de la campagne 3, en hiver que les paramètres principaux

sont le pH, la salinité et la température. Lors des campagnes 1 et 4, les nutriments s'ajoutent aux paramètres physico-chimiques.

La température est une variable environnementale importante qui détermine, directement ou indirectement, la biomasse, la productivité et la composition cellulaire de tous les groupes phytoplanctoniques (Eppley 1972; Sarmiento et al. 2004; Zinser et al. 2007). En particulier, la température affecte directement les processus physiologiques qui régulent les taux de croissance (Eppley 1972; Raven and Geider 1988). Sur le terrain, la température influence également la dynamique physique de la colonne d'eau et la disponibilité des nutriments et de la lumière (Eppley 1972; Johnson et al. 2006; Behrenfeld et al. 2006), ce qui rend difficile l'isolement des effets spécifiques de chaque paramètre individuel. Le lien entre la variabilité biologique et la température peut donc potentiellement n'être dû qu'à l'interaction des facteurs abiotiques, les communautés répondant au milieu non pas directement à la température.

La salinité notamment semble avoir une influence particulière. Une salinité plus faible correspond à des apports d'eaux douces du Rhône. Il a été démontré que les apports d'eau douce constituaient d'importantes sources en nutriments (Ludwig et al. 2009) avec le Rhône et le Pô comme étant les deux plus grands fleuves d'alimentation, représentant environ un tiers de l'apport total d'eau douce en mer Méditerranée (Ludwig et al. 2010). Les bactéries sont familières aux substrats apportés par l'eau douce, et souvent sont dominantes dans ces environnements là, ce qui correspond à une distribution classique observée dans le panache du Rhône (Kirchman et al. 1989; Pujopay et al. 2006). A l'opposé, les cyanobactéries sont retrouvées lorsque les ressources sont moins concentrées. Des distributions similaires des communautés picophytoplanctoniques ont déjà été décrites où le gradient de salinité a été identifié comme un facteur important de la structure de ces communautés (Bonato et al. 2015, 2016).

L'analyse de redondance et des corrélations permettent de mettre en évidence ces liens forts entre les données biologiques et ces variables. Ainsi, la distribution des communautés planctoniques semble largement plus influencée par l'apport d'eau douce du Rhône dans le Golfe de Fos que par la pollution des exutoires. Cependant, ces résultats ne permettent pas non plus d'affirmer l'absence d'effet des sous-produits de chloration sur la structure des communautés picoplanctoniques présentes dans le Golfe de Fos. En effet, l'influence des autres variables abiotiques et le contexte de multi pollution du golfe pourraient masquer leur l'impact lors des analyses in vivo.

3.2. Évaluation de la toxicité in-vitro du BMF, du TBAA et du TBP sur le développement embryonnaire d'oursin

Dans cette étude, les embryons ont été exposés à une gamme de concentrations de bromoforme (BMF), d'acide tribromoacétique (TBAA) et de tribromophénol (TBP) pendant 48 heures, de la fertilisation au stade *Pluteus* (48 hpf). Le contrôle avec 0,1 % de DMSO n'était pas toxique pour les larves et nous avons trouvé des courbes dose-réponse typiques, à partir desquelles les EC₅₀ et EC₉₀ ont été extrapolées (Figure 32, Tableau 9)(Lebaron et al. 2019).

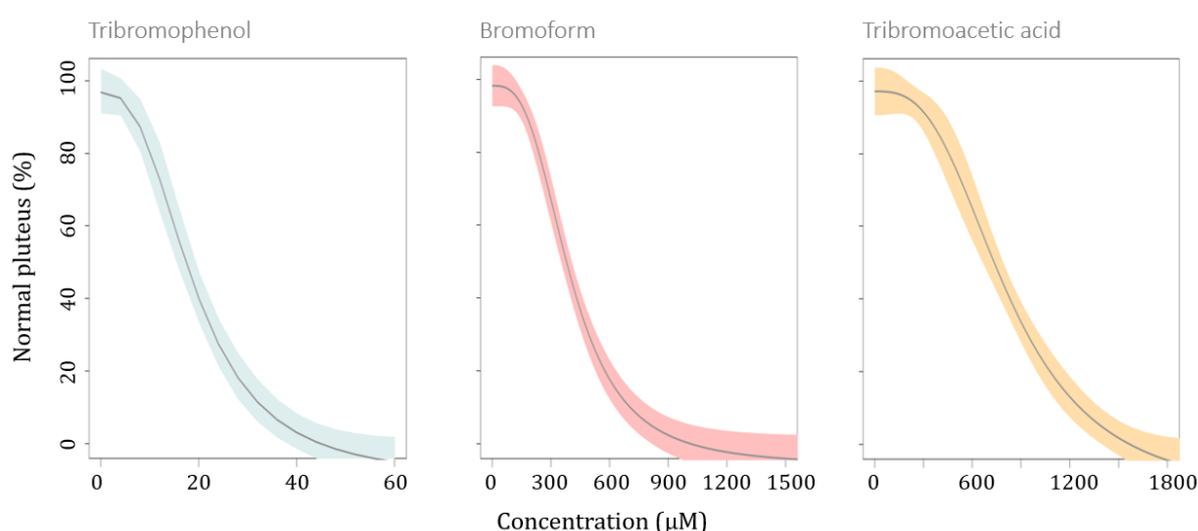


Figure 32 : Courbe dose-réponse pour les trois molécules testées

Le TBP est de loin la molécule la plus toxique, comparativement au BMF et au TBAA (Tableau 9). Le BMF s'est révélé plus toxique que le TBAA. Cet ordre de toxicité a été régulièrement signalé chez plusieurs organismes aquatiques vivant en eau douce ou marine (Yoshioka et al. 1985; Yang and Zhang 2013; Liu and Zhang 2014; Teixidó et al. 2015; Hanigan et al. 2017).

Comme d'autres organismes aquatiques (Yoshioka et al. 1985; Delacroix et al. 2013; Liu and Zhang 2014; Teixidó et al. 2015; Hanigan et al. 2017), les embryons de *P. lividus* étaient sensibles aux concentrations relativement élevées des molécules testées. La EC₅₀ était de 14,5µM pour le TBP, de 526,31µM pour le BMF et de 923,5µM pour le TBAA, et la LOEC la plus faible était de 3µM avec le TBP (Tableau 9). Mis à part pour le

bromoforme, *P. lividus* semble plus sensible au TBP et au TBAA que les embryons du polychète marin *Platynereis dumerilii* (Yang and Zhang 2013) ou les algues vertes phytoplanctoniques *Tetraselmis marina* (Liu and Zhang 2014). En effet, selon 3 études précédentes, la EC₅₀ du bromoforme pour *P.lividus* est comprise entre la EC₅₀ chez le poisson zèbre (200µM, (Teixidó et al. 2015)) et la EC₅₀ chez les embryons polychètes (730µM, (Yang and Zhang 2013)). En ce qui concerne le TBP et le TBAA, notre modèle semble 4 à 14 fois plus sensible au TBP et 4 à 6 fois plus sensible au TBAA que les autres systèmes biologiques (Yang and Zhang 2013; Liu and Zhang 2014; Teixidó et al. 2015).

Tableau 9 : Les différentes valeurs de toxicité pour les trois DBPs étudiés

	Bromoforme	Tribromophénol	Acide tribromoacétique
NOEC µM	3,96 ^{E01}	1,51 ^{E00}	1,69 ^{E02}
LOEC µM	1,98 ^{E02}	3,02 ^{E00}	3,37 ^{E02}
EC ₅₀ µM	5,26 ^{E02}	1,45 ^{E01}	9,23 ^{E02}
EC ₉₀ µM	1,05 ^{E03}	3,14 ^{E01}	1,78 ^{E03}

Le premier effet observable (LOEC) des trois produits chimiques de notre modèle a été le développement anormal des larves. Chez les *Pluteus* exposés à des concentrations plus élevées, nous avons observé un développement anormal et retardé, principalement entre les stades morula et gastrula, dans des proportions relatives différentes selon la molécule et la concentration. Parmi les anomalies de développement provoquées par les trois produits chimiques, nous avons surtout observé des spicules croisés, qui comptent parmi les malformations les plus régulièrement signalées chez les larves d'oursin (Gharred et al. 2016). Il est intéressant de noter que la mortalité induite par le TBAA a été détectée tôt, car nous avons observé une majorité d'œufs précocement morts, de couleur noire.

L'exposition pendant 48 heures à un mélange des trois molécules a réduit de façon critique la proportion de larves *Pluteus* normales, à 63 % ± 2 et 18 % ± 1 pour la NOEC et la LOEC respectivement, alors qu'aucune n'a survécu à l'exposition à la EC₅₀, ce qui démontre l'effet combiné de ces substances. Cependant, chez les embryons du poisson

zèbre, l'influence de l'eau chlorée n'a pas eu d'impact phénotypique détectable après 5 jours d'exposition, ce qui suggère qu'un environnement aquatique complexe, contenant une grande diversité de DBPs à des concentrations beaucoup plus faibles que celles testées, peut ne pas être délétère pour la population (Hanigan et al. 2017). Néanmoins, l'exposition chronique des poissons adultes à 0,9 nM de TBP pourrait potentiellement avoir un effet significatif sur un certain nombre de générations, sur la survie, le développement larvaire et le taux de malformation (Deng et al. 2010).

Nous avons également testé l'impact de l'exposition contrôlée de polluants sur des embryons issus d'adultes chroniquement exposés au golfe de Fos. Ces embryons du golfe ont été exposés au TBP, au BMF et au TBAA à leurs LOEC, EC₅₀ et EC₉₀ respectives, et au cocktail de LOECs. Ils se sont révélés légèrement moins sensibles au TBP et au TBAA que les embryons du site non pollué, tout en étant très résistants au BMF, qui est la molécule la plus répandue dans le golfe (Figure 33)(Manasfi et al. 2018). De plus, l'exposition à un mélange de LOECs a réduit la proportion de larves *Pluteus* normales de 40 % au lieu de 80 % pour les embryons NPS. Cette résistance accrue des embryons du golfe pourrait s'expliquer soit par une sélection larvaire naturelle, avec une meilleure adaptation au site pollué, soit par un effet parental (Ross et al. 2016).

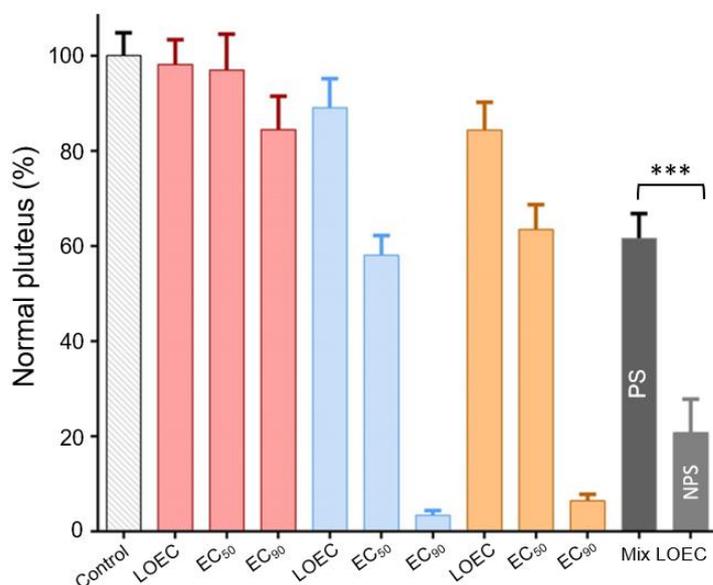


Figure 33 : Effet du bromoforme (rose), tribromophénol (bleu) et de l'acide tribromoacétique (orange) seul et en cocktail de LOECs (gris), sur le pourcentage de larves *Pluteus* bien développées issus d'adultes pêchés dans le golfe de Fos (site pollué, PS) et d'un site non pollué (NPS), après 48 heures d'exposition

*** $p < 0.05$ (Dunnet's test)

3.3. Evaluation du stress oxydant associé aux DBPs

Les résultats des dosages antioxydants-oxydants sont résumés sur la Figure 34. Nos pools de larves contiennent entre 5000 et 15000 larves en fonction des dosages, afin de normaliser les résultats entre chaque condition, tous les résultats sont exprimés en fonction de la concentration en protéines totale mesurée par pool.

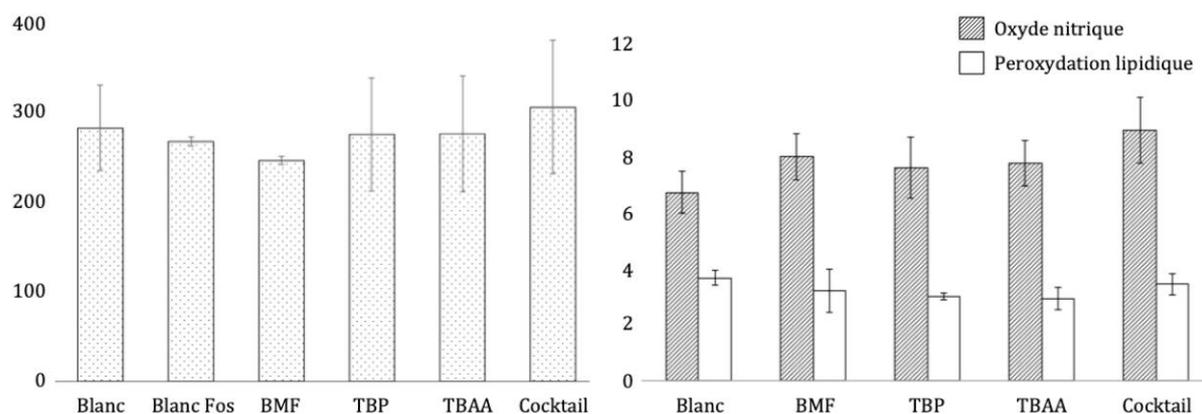


Figure 34 : Evolution des espèces antioxydantes des larves *Pluteus* à la suite d'une exposition de 48 heures aux LOECs des différents DBPs (à gauche) et l'évolution de deux oxydants (à droite).

Aucune différence significative n'a été observée, quels que soient les conditions ou les paramètres mesurés. Il semblerait que les DBPs testés n'entraînent pas de stress oxydant sur les jeunes stades larvaires de *P.lividus*. Dans l'étude de Llana-Belloch et al. (2016), une même conclusion a été tirée sur des baigneurs. En effet, bien que des problèmes respiratoires aient été reportés, aucun résultat n'a été statistiquement différent pour mettre en évidence un potentiel stress oxydant sur les cellules sanguines.

Les espèces réactives de l'oxygène ont pourtant été définies comme intermédiaire de la toxicité du chloroforme et de divers halométhanés en 1985 par (Tomasi et al. 1985). Plusieurs études ont montré que les DBPs pouvaient entraîner un stress oxydant (Beddowes et al. 2003; Yuan et al. 2006; Sapone et al. 2007; Abdel-Naim et al. 2009). La différence principale avec ces études est la conception expérimentale. En effet, les temps d'exposition varient de quelques minutes à 48 heures dans nos protocoles d'exposition. De plus ce sont souvent des souris qui sont utilisées et l'exposition est orale. Il semblerait que pour nos conditions d'exposition et notre espèce d'étude il n'y a pas d'impact par ces concentrations de DBPs à ce stade de développement.

De plus en conditions d'exposition prolongée, il est possible que l'équilibre redox dans les cellules ait eu le temps de s'ajuster. Dans nos conditions expérimentales, on ne voit pas de différence aux niveaux d'exposition LOEC par rapport aux témoins. Il semble donc que le stress oxydant ne soit pas à lui seul responsable de la toxicité en condition cocktail. Des résultats similaires ont déjà été rapportés, après 30 minutes d'exposition les dommages à l'ADN ont été réparés (Kreja et al. 2003).

3.4. Évaluation de la génotoxicité du mélange

Le test des comètes a été largement utilisé pour tester les effets génotoxiques potentiels des polluants environnementaux, dans plusieurs organismes modèles tels que les embryons animaux et les racines végétales, car il s'agit d'une méthode efficace pour détecter les ruptures d'ADN simple et double brin (Yıldız et al. 2009; Liman et al. 2011). Les résultats obtenus à partir de l'analyse des comètes sont résumés par la Figure 35. Nous avons testé si une exposition d'une heure à des mélanges de TBP, BMF et TBAA, à leurs NOEC, LOEC et deux fois leur LOEC respective, pouvait induire une rupture des brins d'ADN chez les larves *Pluteus*. Il est probable qu'étant donné l'exposition à court terme, nous avons observé le potentiel de nos mélanges d'induire des ruptures de brins d'ADN, avant toute activation des mécanismes de réparation. Le niveau de génotoxicité a été évalué chez les témoins positifs et négatifs et les groupes exposés en fonction de l'OTM et du pourcentage d'ADN (% ADN) mesuré dans la queue de la comète. De plus, nous avons évalué la proportion de cellules au sein de chaque groupe ayant dépassé une valeur seuil, correspondant au 95e percentile du groupe témoin pour l'OTM et le % d'ADN. Dans des conditions contrôlées, les 95e percentiles pour l'OTM et le % d'ADN étaient de 2,6 % et 16,5 %, respectivement. Pour les deux paramètres considérés, nous avons trouvé des distributions de données normales dans le groupe témoin négatif (Shapiro-Wilk, $p=0,1$) mais pas dans les groupes testés ni dans le groupe témoin positif (Shapiro-Wilk, $p<0,0001$). Le test n'a pas révélé d'influence significative du niveau d'exposition basé sur l'OTM mais a démontré que le groupe exposé au mélange à deux fois la LOEC (LOEC_X2), avait significativement plus d'ADN dans la queue de la comète, comparé à tous les autres groupes (Kruskal-Wallis, $p<0.033$). Ce résultat suggère qu'uniquement cette dernière condition a eu un effet génotoxique. Cependant, l'écart entre les résultats des groupes témoins et ceux des groupes testés quant à la normalité de la distribution des données indique que l'exposition a eu une influence sur une

fraction des cellules de chaque groupe, tel que rapporté précédemment (Taban et al. 2004). En effet, la proportion de cellules avec un OTM supérieur à 2,6 augmente régulièrement avec la concentration et donne des valeurs OTM plus élevées que celles observées dans le groupe témoin négatif (Figure 35a). Cette augmentation de la proportion de cellules a également été observée pour le paramètre % d'ADN, bien qu'elle soit clairement perceptible à l'état LOEC_X2 (Figure 35b). Par conséquent, dans l'ensemble, nos résultats suggèrent une relation dose-effet lorsqu'on tient compte à la fois de l'effet sur l'ADN et de l'occurrence des cellules qui répondent. Des résultats similaires ont déjà été rapportés dans des expériences d'exposition à court terme, telles que celles réalisées sur des cellules CHO (ovaires de hamster chinois) exposées au TBA pendant 4 h (Plewa et al. 2008).

Il est intéressant de noter qu'à la condition LOEC_X2, nous avons constaté que 7 % des cellules étaient réparties avec plus de 90 % de leur ADN dans la queue de la comète. Parmi celles-ci, quelques cellules affichaient également une valeur OTM élevée, qui se rapporte à la longueur de la comète. Un résultat similaire a également été obtenu avec certaines cellules du groupe témoin positif (Figure 35b). Cela pourrait indiquer un début d'apoptose (Ríos et al. 2003). D'autres études en ont déjà apporté la preuve. Il a en effet été démontré que le peroxyde d'hydrogène pouvait induire l'apoptose, causant la mort cellulaire en moins de deux heures dans les cellules exposées à plus de 400 μ M de H₂O₂ (Xiang et al. 2016). Une étude récente a également suggéré que les DBPs pourraient déclencher l'apoptose à des concentrations élevées (Ríos et al. 2003). Ainsi, dans notre étude, le cocktail de DBPs pourrait avoir le potentiel de déclencher également l'apoptose dans une fraction des cellules larvaires.

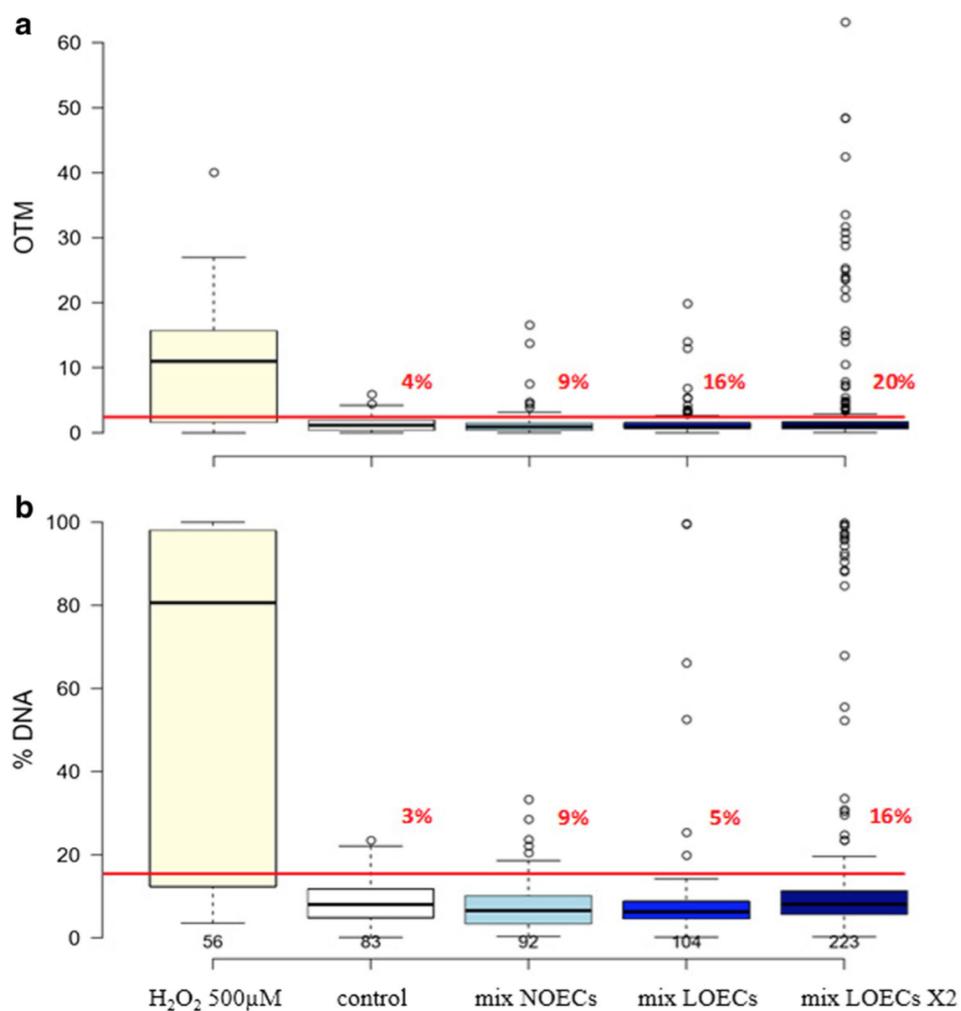


Figure 35 : Distribution de l'OTM (a) et du % d'ADN dans la queue de la comète (b) en fonction du niveau d'exposition des larves de *Pluteus* au mélange chimique.

Les boxplots regroupent les 1er et 3ème quartiles. La médiane est représentée par la ligne noire à l'intérieur du boxplot. La ligne rouge indique le percentile à 95 % de la condition de contrôle utilisée comme référence, et les chiffres en rouge indiquent la proportion de comètes présentant une valeur supérieure à la référence.

4. Conclusion

Finally, ce que l'on peut retenir pour la suite, concernant l'effet sur site des rejets industriels sur les communautés picoplanctoniques, il semblerait que les paramètres physico-chimiques ainsi que les nutriments soient les facteurs les plus contraignants. L'impact des DBPs sur le premier maillon de la chaîne alimentaire est noyé par un effet de dilution trop important et un contexte de site multi-pollué, soumis à des entrées d'eau douce riche en nutriments. Cette hypothèse se confirme par la suite puisque les premiers effets néfastes observés des DBPs pour la survie de cette communauté picoplanctonique se manifestent à une concentration avoisinant les mg/L.

Les tests in-vitro sur les larves d'oursins ont permis d'approfondir nos connaissances sur l'impact du bromoforme, du tribromophénol et de l'acide tribromoacétique, testés seuls ou en combinaison, sur leur développement. Nous avons vu que les trois molécules pouvaient altérer le développement embryonnaire. Le tribromophénol étant la molécule la plus toxique jusqu'à 10 à 30 fois plus que les deux autres molécules, et l'acide tribromoacétique la moins toxique. Le mélange des trois DBPs a également considérablement entravé le développement, passant de 20% d'effet néfaste cumulé théorique à 80% d'effet néfaste en pratique, un sensible effet synergique entre nos 3 molécules semble exister. En revanche, lorsque ces expériences ont été réalisées sur les jeunes stades larvaires d'oursins pêchés dans le golfe de Fos, une tolérance significative au bromoforme s'est révélée. Cette réponse s'est retranscrite lors de l'exposition au cocktail de molécules également avec seulement 30% d'effet néfaste mesuré.

Le passage de la concentration du mélange de NOEC à LOEC augmente significativement la cytotoxicité, ainsi que le niveau de dommage de l'ADN et la proportion de cellules affectées. Nous n'avons cependant pas montré de stress oxydant significatif lors d'une exposition aux LOECs de 48 heures.

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence un potentiel d'interaction génome-environnement pour les larves de Fos, en particulier en ce qui concerne le bromoforme.

Mais d'où vient cette résistance, quelle est l'influence parentale ?

CHAPITRE 4 : Adaptation locale des oursins issus du golfe de Fos

Dans le chapitre précédent, nous avons montré une sensibilité différente des larves issues d'adultes du Golfe de Fos comparativement aux larves provenant d'adultes non exposés, suggérant une possible adaptation locale.

Cette partie présente les travaux réalisés pour tester l'hypothèse que l'environnement du golfe de Fos exerce effectivement une pression de sélection sur les populations d'oursins, avec des approches transcriptomiques et génomiques.

Dans l'approche transcriptomique, nous avons caractérisé les patrons d'expression d'un panel de 20 gènes d'intérêt. Dans l'approche génomique, nous avons cherché des régions du génome sous sélection, en comparant les génomes d'individus adultes vivant dans le golfe de Fos, à ceux d'individus adultes vivant en zone non exposée.

1. Introduction

Un stress est un facteur intrinsèque ou extrinsèque obligeant un organisme à ajuster son comportement ou sa physiologie pour y faire face (Yousef 1985; Barton and Iwama 1991; Barton 2002). Autrement dit, les organismes ont le « choix » entre la migration vers un site plus propice ou bien l'acclimatation aux stress par la mise en place d'une réponse moléculaire adaptée, ou inévitablement la mort. En fonction de la biologie propre à chaque espèce, les stratégies de réponse aux stress et les conséquences à l'échelle des populations et des communautés sont différentes.

Sous l'effet d'un stress telle qu'une exposition à une substance toxique, les organismes doivent mettre en place des réponses physiologiques (détoxification ou élimination des substances toxiques) leur permettant de retourner à un état compatible avec leur survie (Barton 2002). Ces nombreuses voies métaboliques mises en œuvre pour éliminer une substance toxique constituent le « défensome » (Goldstone et al. 2006).

L'adaptation locale correspond à l'aptitude des individus d'une population, exposée à un stress, de répondre de manière plus efficace que des individus d'autres populations non exposées à ce stress. Des exemples d'adaptation locale ont été observés chez des organismes terrestres et marins (Brennan et al. 2016; Lopez et al. 2019).

Trois grandes hypothèses peuvent être proposées pour expliquer l'adaptation locale : l'effet maternel, la sélection des larves à un moment donné de leur développement et la régulation épigénétique (Kawecki and Ebert 2004; Villemereuil 2016), qui permet de fixer, dans le long terme les modalités d'expression du génome en réponse à des perturbations. Les trois effets pouvant agir simultanément.

- L'effet maternel résulte de la présence de molécules propices à la résistance au stress local, qui s'accumule dans les ovocytes au cours de l'ovogénèse. Ces molécules peuvent tout aussi bien être des ARNm maternels qui seront traduits en protéines ou d'autres molécules permettant la résistance. Dans cette hypothèse, on peut imaginer, lors d'une exposition chronique, que cet effet s'estompe au cours du développement (Wong et al. 2019).
- D'autre part, la sélection peut agir comme un filtre sur une population larvaire accédant au milieu stressant, dans lequel elles vont se fixer, métamorphoser, grandir et se reproduire. Dans ce cas, les individus les mieux adaptés ont

possiblement des patrimoines génétiques adaptés à la réponse au stress du milieu (Kristensen et al. 2018). Il est possible que la sélection agisse sur les populations à différents stades de vie des organismes (embryonnaires, larvaires, juvéniles, adultes) (Kristensen et al. 2018). Cependant il est très probable que l'effet du milieu soit le plus fort sur les premiers stades de vie, embryonnaires et larvaires (Gosselin and Qian 1997; Kurihara 2008; Dupont and Thorndyke 2009; Byrne 2011).

- Enfin, la régulation épigénétique de l'expression du génome consiste en une modification chimique de la chromatine, soit au niveau des cytosines (méthylation des cytosines dans les motifs CpG) soit au niveau des histones qui règlent l'accessibilité des gènes (Bird 2007).

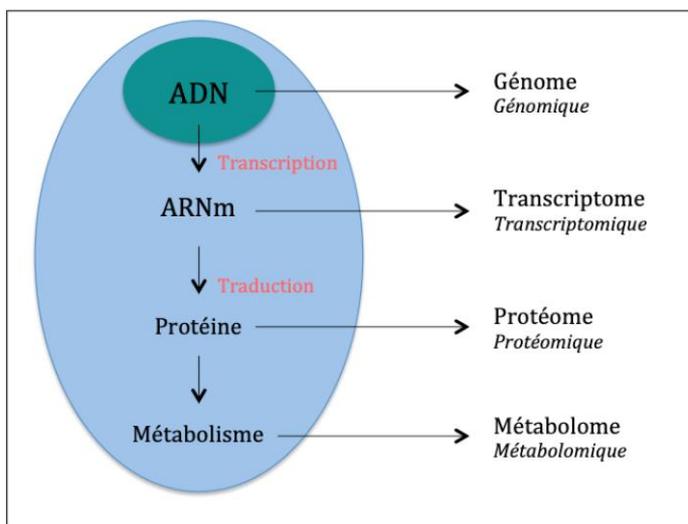


Figure 36 : Les différentes approches « -omics »

La recherche d'adaptation locale repose ainsi sur la comparaison de profils moléculaires entre individus de populations différentes. ici provenant d'un milieu pollué versus non pollué (Bozinovic and Oleksiak 2011; Whitehead et al. 2011).

- L'analyse transcriptomique permet d'évaluer une différence de profil d'expression (Figure36). La cellule adapte sa physiologie en modulant l'expression de son génome. Des différences de réponses transcriptomiques en fonction de la population d'origine, pour un même stress, seront interprétées comme la signature probable d'une adaptation locale.

- La comparaison des génomes des individus de différentes populations permettrait de mettre en évidence des régions du génome particulières qui se rencontreraient essentiellement (plus qu'attendues sous l'hypothèse de neutralité) dans les populations adaptées. Ces régions particulières (par exemple codantes pour des protéines ou des régions régulatrices), pourraient être propices à l'établissement de la résistance des oursins de du golfe de Fos.

2. Plan d'expérience

2.1. Protocole opératoire

Les individus provenant du site pollué, ont été pêchés dans le golfe de Fos, ceux provenant du site contrôle (NPS), ont été pêchés dans la réserve naturelle marine de Calvi.

Pour Calvi comme pour Fos, des adultes ont été récupérés le matin même du début de l'expérience.

Dix couples indépendants ont été utilisés pour la production des larves. Les œufs fécondés de chaque couple ont été mélangés dans un bac de 80L de telle sorte que chaque couple a contribué équitablement au pool de larves (Figure 37). La densité par bac est de 5 larves par mL. Les bassins sont alimentés en eau de mer naturelle, pompée au large de la Corse et filtrée sur filtre à sable. Quarante pour cent de l'eau sont renouvelés chaque jour. A partir de 72 heures après la fécondation, les larves sont nourries *ad libitum* avec du phytoplancton.



Figure 37 : Photos des conditions d'aquaculture. A : ponte des oursins ; B : bassins de 80L

Nous avons disposé de quatre bassins de 80L pour notre expérience. Deux ont été consacrés aux larves issues des adultes prélevés à Fos et deux consacrés à celles produites par les adultes prélevés à Calvi.

Pour chaque population, un des deux bassins a accueilli des larves non imprégnées, l'autre des larves imprégnées (Figure 38). En effet, nous avons exposé pendant 48h un lot d'œufs fécondés, aux concentrations environnementales de nos 3 DBPs (i.e. 20 µg/L pour le bromoforme, 3 µg/L pour le tribromophénol, et 50 µg/L pour l'acide tribromoacétique) afin de tester un effet « mémoire » de l'exposition précoce. Nous appelons ce lot « larves imprégnées ».

La Figure 38 résume les modalités expérimentales de l'exposition des larves.

Pour chaque exposition, environ 20 000 larves sont prélevées des bacs de 80L, puis exposées, pendant 48 heures, à différents polluants (Figure 38) ou à l'eau de mer propre (Témoin négatif), dans une bouteille ambrée de 1L.

Les lots de larves ont été exposés à l'eau réelle du golfe de Fos et au mélange de NOECs des 3 DBPs étudiés. Nous avons également disposé de témoins positifs, en effet, les mêmes lots de larves ont été exposés à deux concentrations d'un mélange d'éléments traces métalliques (Richir 2012) en parallèle de nos manipulations par Ouafa El Idrissi, doctorante de l'Université de Corte (Tableau 10). Les lots de larves non exposées, élevées avec l'eau de mer filtrée ont constitué les témoins négatifs expérimentaux.

Les embryons ont été exposés 48 heures, de la fécondation jusqu'au stade *Pluteus* (48hpf) et du stade *Pluteus* jusqu'au stade 4 bras (96 hpf).

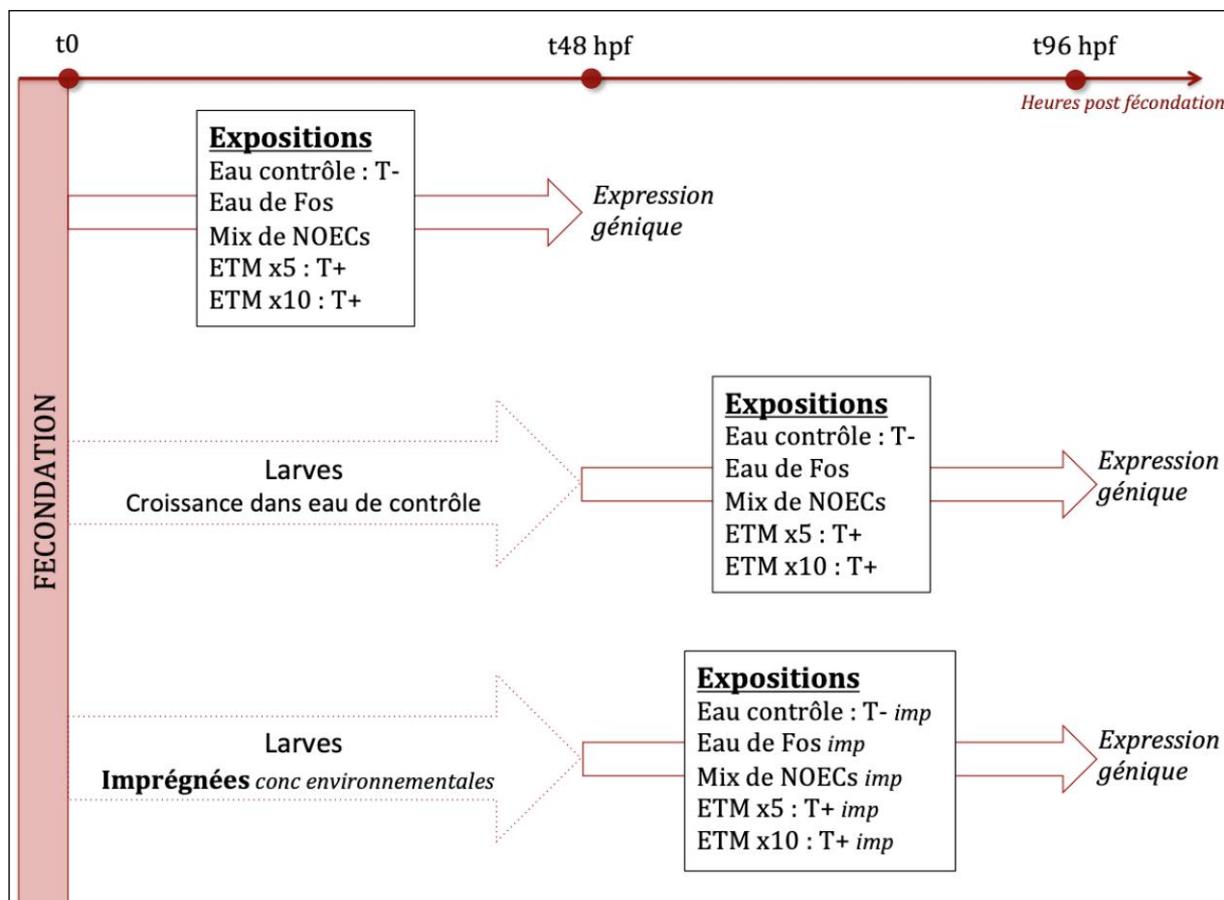


Figure 38 : Résumé du plan expérimental suivi. 3 expositions différentes ont été entreprises pour chaque site géographique étudié.

Tableau 10 : Concentrations des différents ETM utilisées pour les expositions des témoins positifs
Chaque ETM ont été ajouté à partir d'une solution mère à 1 g/L dans HNO₃

Eléments traces métalliques	Ag	As	Al	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Mo	Ni	Pb	V	Zn
Concentration moyenne µg/L	0,1	1,6	0,7	0,1	0,1	0,2	0,3	1,1	0,4	0,6	11,1	0,4	0,1	1,7	1,5

2.2. De l'extraction des ARN totaux à la quantification des ARNm suivis

En fin d'exposition, les larves ont été collectées par filtration. Les filtres ont ensuite été immergés dans une solution de Trizol puis conservés à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN totaux. Les ARN ont été purifiés à l'aide du mini kit RNeasy de QIAGEN. Les concentrations ont été mesurées au Nanodrop puis normalisées à 50ng/μL. La pureté des échantillons (absence d'ADN) a été évaluée en mesurant les rapports d'absorbance 260/280 nm et par évaluation sur gel d'agarose.

Cinq cents nanogrammes d'ARN totaux ont été rétrotranscrits à l'aide du kit Promega Goscript™ reverse transcriptase system, en utilisant des amorces aléatoires (random hexamer - Eurogentec), selon les recommandations du fournisseur. Les ADN complémentaires (ADNc) obtenus ont été dilués 10 fois, puis conservés à -20°C.

L'abondance des transcrits analysés a été déterminée en qPCR. Les ADNc ont été distribués en microplaques 384 puits, ce qui a permis d'analyser l'ensemble des échantillons, c'est à dire les différents stades larvaires et toutes les conditions d'exposition, pour 2 gènes simultanément, en triplicat sur une même plaque.

La qPCR a été réalisée avec le LightCycler®480 II, suivant le programme d'amplification présenté ci-dessous (Tableau 11).

Tableau 11 : Programme du LightCycler 480

Etapes	Température °C	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation	95	5 min	1
Amplification	95	10 sec	45
	58	20 sec	
	72	20 sec	
Courbes de fusion	95	5 sec	1
	60	1 min	
	95	Continue*	
Refroidissement	40	30 sec	1

(*) : la détection de la fluorescence est continue lors du changement de température de 60°C à 95°C.

La qPCR permet d'obtenir une valeur caractéristique, le cycle seuil, appelé Cp, qui représente le premier cycle d'amplification à partir duquel l'ADN amplifié est détectable. Plus l'échantillon mis en jeu lors de la réaction contient d'ADNc cible, plus la valeur du Cp est faible.

Les résultats sont exprimés comme la moyenne des triplicats de Cp obtenus, normalisés par la moyenne des Cp obtenus, pour la même condition, d'un gène de référence, ici gapdh (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). Les taux d'expression sont ensuite lissés en fonction de la condition contrôle suivant la formule (formule 2 $\Delta\Delta$):

$$\frac{2^{-(Cp_{ech} - Cp_{GAPDH})}}{2^{-(Cp_{T_{ech}} - Cp_{GAPDH})}}$$

2.3. Les gènes étudiés

Nous avons choisi un panel de gènes impliqués dans différentes fonctions physiologiques : réponse au stress, croissance, détoxification, apoptose. Ils sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Liste des gènes étudiés et leur fonction

Nom des gènes	Fonction
ATP synthase	L'ATP synthase est une enzyme qui crée la molécule de stockage d'énergie adénosine triphosphate (ATP). L'ATP est la "monnaie énergétique" la plus couramment utilisée par les cellules pour tous les organismes.
Na ⁺ /K ⁺	La pompe sodium/potassium aide à maintenir le potentiel de repos, affecte le transport et régule le volume cellulaire.
Glutathion S-transférase (GST)	Métabolisation (phase II) des xénobiotiques.
MADDL	Joue un rôle régulateur important dans la mort physiologique des cellules.
BCL2	Régulateurs antiapoptotiques
Bax	Régulateurs proapoptotiques
p38	Gène impliqué dans la différenciation cellulaire, l'apoptose et l'autophagie.
Hsf1	Facteur de transcription joue un rôle central dans l'expression d'une grande classe de protéines de choc thermique (HSP) de chaperons moléculaires qui protègent les cellules des agressions cellulaires.
Hif	Facteur de transcription permettant aux cellules de s'adapter à des conditions à faible teneur en oxygène.
TL	La télomérase remplace de courts fragments d'ADN appelés télomères, qui sont autrement raccourcis lorsqu'une cellule se divise par mitose.
p53	Le p53 (« tumor protein 53 ») est un facteur de transcription régulant de multiples fonctions cellulaires importantes comme la régulation du cycle cellulaire, l'autophagie ou l'apoptose.
DNMT3A	L'enzyme ADN méthyltransférase 3 alpha produite, aide à ajouter des groupes méthyles aux éléments constitutifs de l'ADN (nucléotides) appelés cytosines.
Protéines de choc thermique (heat shock protein) HSP 60, 70, 40 (DNAJ)	Elles ont la fonction de chaperon moléculaire. Elles sont impliquées dans la protection et la réparation des protéines.
Métallothionéines (MT1, MT5, MT7)	Elles interviennent dans la détoxification des métaux essentiels revêtant un caractère toxique lorsqu'ils sont présents en et permettent également la séquestration de métaux toxiques à caractère non-essentiel.
NRD1	Joue un rôle dans la migration et la prolifération cellulaire.
SOD Mn	Les SOD permettent d'éliminer les espèces réactives d'oxygène mitochondrial (ROS) et ainsi de protéger la mort cellulaire. La protéine formée joue un rôle anti-apoptique face au stress oxydant, au rayonnement ionisant, aux cytokines inflammatoires.

2.4. Statistiques

Pour tenir compte de l'absence de réplicat biologique (i.e. un bac d'élevage par condition testée), nous avons réalisé des analyses en composante principale (ACP), ce qui permet de visualiser des différences de profil d'expression globale. Les statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (version 3.6.1, 2019), et le package FactoMineR. Les ACP ont été réalisées en considérant l'ensemble des gènes suivis, quelle que soit leur contribution individuelle.

Compte-tenu de la normalisation des profils d'expressions par ceux des témoins, les conditions « Témoins » sont centrées sur l'axe des ACPs, et n'ont pas été représentées sur les graphiques.

A titre indicatif, le barycentre des variables qualitatives de la réponse transcriptomique globale est représenté. Il donne une information sur les modalités générales de la réponse d'une population, indépendamment du stress expérimental testé et de l'âge des larves.

3. Résultats et discussion

Pour tester l'hypothèse que nos deux populations, Fos et Calvi, au trait d'histoire de vie contrasté, présentaient des différences de réponse transcriptomique, lorsqu'elles étaient soumises aux mêmes stress, nous avons choisi une approche gène candidats. Ainsi nous avons fait l'hypothèse que les gènes considérés, en lien avec la gestion du stress, la détoxification ou à la survie cellulaire, seraient à priori pertinents.

Les profils d'expression obtenus ont permis de mettre en évidence des différences entre les deux populations, au niveau des témoins négatifs, en fonction des niveaux de pollutions et de la nature du stress.

3.1. Le cas des témoins négatifs

Les évolutions des abondances des transcrits au cours du temps diffèrent d'une population à l'autre (Tableau 13). L'abondance des transcrits reste globalement constante entre 48h et 96h chez les larves de Fos. Seuls *bcl2*, *bax* et la pompe Na/K ATPase diminuent de l'ordre d'un facteur deux à quatre. Au contraire, 10 des 17 gènes analysés sont moins abondants à 96h qu'à 48h, de l'ordre d'un facteur 3 à 7, chez les larves de Calvi. Cependant, cette diminution d'abondance ne concerne pas les métallothionéines, *bcl2*, les gènes de stress *hsf1* et *hsp60* et *gst*.

Tableau 13 : Fluctuations d'abondance des transcrits selon le stade de développement.

	Temoins Fos (48 hpf)	Temoins Fos (96 hpf)	Rapport	Temoins Calvi (48 hpf)	Temoins Calvi (96 hpf)	Rapport
MT1	9,01E+06	8,45E+06	1	1,01E+06	1,88E+06	1
MT5	2,40E+07	5,47E+07	0	5,56E+06	3,12E+06	2
MT7	2,99E+09	2,83E+09	1	1,43E+08	7,81E+08	0
ATPs	2,66E+07	4,44E+07	1	2,71E+07	7,01E+06	4
MADDL	2,46E+06	2,16E+06	1	3,40E+06	1,06E+06	3
NRD1	8,06E+05	1,09E+06	1	3,03E+06	4,41E+05	7
BCL2	1,97E+07	8,93E+06	2	1,35E+07	1,02E+07	1
NaK	3,50E+07	9,05E+06	3,87	2,28E+07	4,57E+06	4,99
Hsf1	1,34E+07	9,34E+06	1	1,79E+07	1,40E+07	1
HSP60	1,94E+08	1,62E+08	1	1,22E+08	6,46E+07	2
Bax	1,26E+07	6,10E+06	2	1,46E+07	3,70E+06	4
p53	1,63E+07	1,33E+07	1	1,34E+07	4,39E+06	3
Hif	8,24E+05	9,45E+05	1	8,76E+05	2,79E+05	3
p38	1,47E+07	8,42E+06	2	1,54E+07	2,88E+06	5
DNAj	9,62E+06	9,21E+06	1	7,52E+06	2,86E+06	3
GST	4,66E+06	2,54E+06	2	1,27E+06	1,71E+06	1
SOD Mn	1,97E+06	1,14E+06	2	1,32E+06	4,54E+05	3

La comparaison des abondances de chacun des transcrits dans les témoins de Fos et de Calvi, montre des profils d'abondances similaires à 48h. A ce stade de développement, seules les métallothionéines 1, 4 et 7 et *gst* sont plus abondantes chez les larves de Fos, d'un facteur 4 à 21 (Tableau 13). Dans les conditions témoins, les larves de Fos possèdent donc des messagers qui leur confèreraient probablement une aptitude à répondre de façon plus efficace que les larves de Calvi à un stress chimique, notamment métallique. Cette différence d'abondances pourrait s'expliquer par une surproduction d'ARN messagers d'origine maternelle, suffisamment stables pour ne pas être dégradés depuis la fécondation jusqu'au moment de nos analyses. Cette hypothèse devra être vérifiée. Cependant, l'influence maternelle sur le transcriptome larvaire s'estompe significativement à la fin du stade blastula. Juste avant le stade *Pluteus*, soit 48 heures post fécondation, les transcrits détectés sont principalement issus de la transcription du génome du zygote et à 96h post fécondation, ils dérivent intégralement du génome zygotique (Wong et al. 2019). Nos mesures, étant réalisées à 48h et 96h, sont ainsi très probablement le reflet de l'expression du génome des larves. Il serait tout à fait envisageable que des facteurs de transcription spécifique des éléments régulateurs des métallothionéines et *gst*, d'origine maternelle, soient également présents et promeuvent l'expression des gènes zygotiques. Des expériences de retard sur gel permettront de tester aussi cette hypothèse.

A 96h, les abondances de transcrits restent inchangées chez les larves de Fos et celles de Calvi diminuent sensiblement. Il apparaît donc que les larves de Fos possèdent

globalement plus de transcrits que celles de Calvi, d'un facteur 3 à 18. Les transcrits codants pour les métallothionéines sont, ici encore, plus abondants chez les larves de Fos.

Ces résultats obtenus sur les témoins vont dans le sens d'une réponse population spécifique, qui intéresserait donc ici, soit les régions génomiques régulatrices des transcrits étudiés, soit des différences en composition et/ou d'abondance de facteur de transcription (facteur TRANS).

Tableau 14 : Profil d'expression pour les larves témoins âgées de 48h et de 96h.

Le rapport entre Calvi et Fos permet de mettre en évidence les différences de taux de transcrit. Les rapports identiques en bleus indiquent un taux de transcrit similaire et en rouge des taux de transcrit de Fos au moins 3 fois supérieurs à ceux de Calvi.

	Temoins Fos (48 hpf)	Temoins Calvi (48 hpf)	Rapport FOS/CALVI	Temoins Fos (96 hpf)	Temoins Calvi (96 hpf)	Rapport FOS/CALVI
MT1	9,01E+06	1,01E+06	9	8,45E+06	1,88E+06	4
MT5	2,40E+07	5,56E+06	4	5,47E+07	3,12E+06	18
MT7	2,99E+09	1,43E+08	21	2,83E+09	7,81E+08	4
ATPs	2,66E+07	2,71E+07	1	4,44E+07	7,01E+06	6
MADDL	2,46E+06	3,40E+06	1	2,16E+06	1,06E+06	2
NRD1	8,06E+05	3,03E+06	0	1,09E+06	4,41E+05	2
BCL2	1,97E+07	1,35E+07	1	8,93E+06	1,02E+07	1
NaK	3,50E+07	2,28E+07	2	9,05E+06	4,57E+06	2
Hsf1	1,34E+07	1,79E+07	1	9,34E+06	1,40E+07	1
HSP60	1,94E+08	1,22E+08	1	1,62E+08	6,46E+07	3
Bax	1,26E+07	1,46E+07	1	6,10E+06	3,70E+06	2
p53	1,63E+07	1,34E+07	1	1,33E+07	4,39E+06	3
Hif	8,24E+05	8,76E+05	1	9,45E+05	2,79E+05	3
p38	1,47E+07	1,54E+07	1	8,42E+06	2,88E+06	3
DNAj	9,62E+06	7,52E+06	1	9,21E+06	2,86E+06	3
GST	4,66E+06	1,27E+06	4	2,54E+06	1,71E+06	1
SOD Mn	1,97E+06	1,32E+06	1	1,14E+06	4,54E+05	3

3.2. Zoom sur l'abondance des métallothionéines

Les métallothionéines sont des protéines non enzymatiques de faible poids moléculaire (12-15 kDa), riches en cystéine. Les groupes thiol (-SH) des résidus cystéines sont responsables de leur forte affinité pour les métaux lourds (Margoshes and Vallee 1957). Les MTs ont été caractérisées dans de nombreux invertébrés aquatiques (Amiard et al. 2006) y compris les mollusques (Bebiano and Langston 1998; Amiard-Triquet et al. 1998; (Ng et al. 2008) et leurs larves (Damiens et al. 2006). Leur synthèse est principalement induite par les métaux 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. Elles sont impliquées dans l'homéostasie des métaux lourds essentiels tels que le cuivre et le zinc, la détoxification des cations métalliques toxiques tels que le cadmium et le mercure (Amiard et al. 2006) et la protection contre le stress oxydatif (Ruttkay-Nedecky et al. 2013; Rios et al. 2018). Selon Bebianno and Machado (1997); Linde et al. (2001); Baudrimont et al. (2003), la concentration en MTs chez les organismes marins peut être utilisée comme un biomarqueur d'exposition aux métaux lourds.

Les transcrits codants pour les métallothionéines (1, 5 et 7) sont significativement sur-représentés ($p = 0,005$) chez les larves de Fos par rapport à celle de Calvi (figure X). Cette observation suggère que les larves de Fos ont une meilleure aptitude à prendre en charge les contaminations métalliques, précocement au cours du développement. Outre les DBPs, le golfe de Fos est aussi contaminé en éléments traces métalliques (Augier et al. 1994). La surabondance de transcrits MT peut ainsi être interprétée également comme une adaptation au stress métallique.

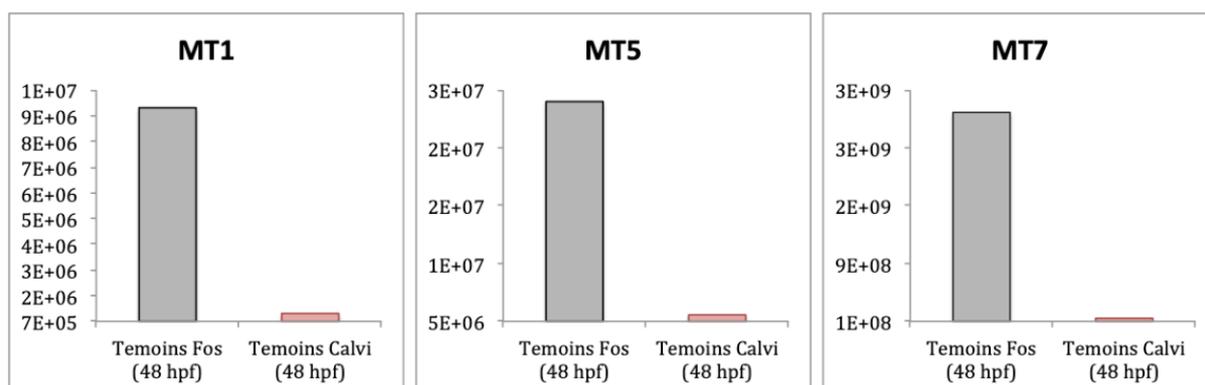


Figure 39 : Zoom sur le taux de transcrit de 3 métallothionéines retrouvé dans les larves de Fos (gris) et les larves de Calvi (rouge).

3.3. Le cas des larves challengées par différents niveaux de pollution

Compte-tenu des résultats précédents, nous avons choisi de comparer séparément les deux stades de développement analysés. Les ACP permettent la comparaison des profils d'expression des larves par rapport aux témoins.

Pour les larves de 48 heures, les deux axes de l'ACP permettent d'expliquer environ 95% de la variation des profils d'expression (Figure 40). L'axe 1 qui en explique 58,8% est construit par la moitié des gènes étudiés ($\text{Cos}^2 > 0,7$) (Tableau 15), ceux principalement

impliqués dans la prolifération cellulaire et la régulation de l'apoptose (bcl2, tl, nrd1, p53, p38), et dans la protection cellulaire (hsp40, hsf1). L'axe 2, qui explique 35,1% de la variation, regroupe les gènes impliqués dans la production d'énergie, la régulation pro-apoptotique et la détoxification de xénobiotique (atp synthetase, dnmt3A, bax, gst...).

Les larves de Fos et de Calvi, lorsqu'elles sont exposées à l'eau réelle du golfe de Fos, sont colocalisées dans l'ACP, ce qui traduit une similitude de profils d'expression. Globalement les larves répriment l'expression de leurs gènes, mais l'écart par rapport aux témoins est faible. L'eau du golfe ne semble donc pas avoir d'effet notable sur la réponse transcriptomique, ce qui pourrait indiquer que ces conditions ne provoquent pas de stress notable sur les premiers stades du développement, quelle que soit l'origine des larves selon les gènes suivis.

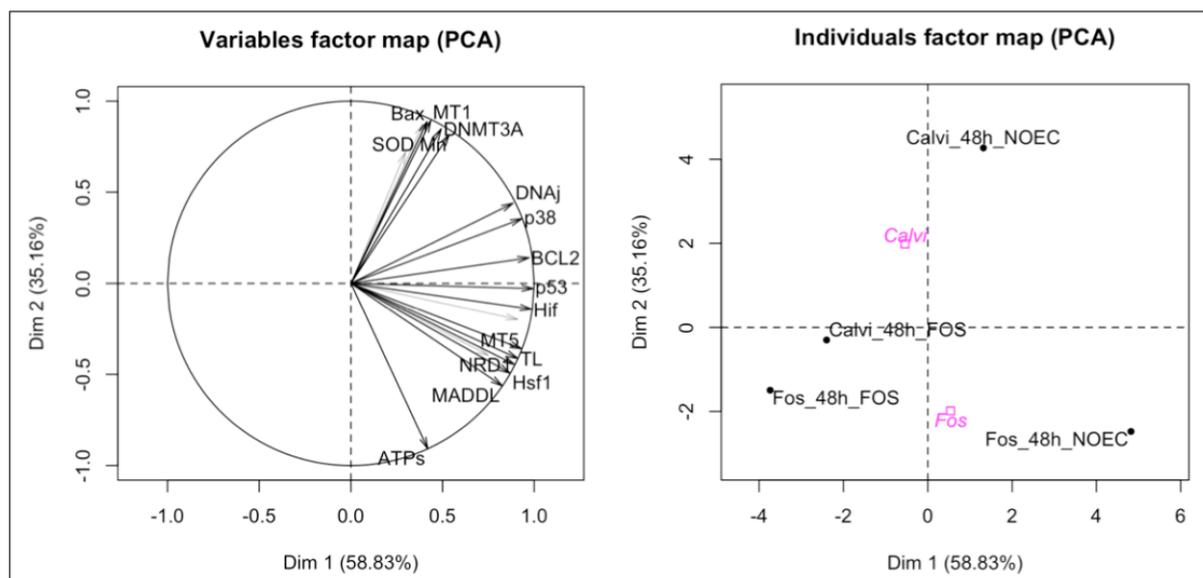


Figure 40 : Analyse en composantes principales du taux de transcrits des différents gènes (variables) et la répartition des individus en fonction de leur site géographique, après 48 h d'exposition à l'eau réelle de Fos et au cocktail de DBPs.

Lorsque les larves sont exposées au mélange de DBPs (i.e. NOEC, 10 mg/L 1 mg/L et 30 mg/L pour le bromoforme, le tribromophénol et l'acide tribromoacétique respectivement), l'ACP montre que les populations de larves de Fos et Calvi ont des profils d'expression sensiblement différents (Figure 40, Tableau 15). Les larves de Calvi sont situées haut sur l'axe 2 et sont peu différentes du témoin sur l'axe 1 (Tableau 15). Cette position dans l'ACP indique une demande en énergie accrue par rapport au témoin,

et la mise en place des systèmes de détoxification. Les larves de Calvi surexpriment aussi *dnmt3A*, qui code pour une méthyltransférase. La surexpression de méthyltransférase est souvent associée à l'expérience d'un stress. L'une des fonctions de *dnmt* est en effet de contenir la réactivation d'éléments mobiles « dormant » du génome, qui peuvent agir comme agents mutagènes, le plus souvent délétères (Campos et al. 2012; Takayama et al. 2014; Dorts et al. 2016). Enfin, *bax* est sensiblement surexprimé, alors que *bcl2* ne l'est pas, ce qui indique probablement une augmentation du nombre de cellules qui s'engagent dans l'apoptose. Cette réponse semble cohérente avec les profils de comètes qui laissaient penser que l'exposition aux DBPs pouvaient déclencher l'apoptose (Boumela et al. 2011; Bonaventura et al. 2011; Galasso et al. 2019).

Les larves de Fos exposées au mélange de DBPs sont principalement positionnées à droite de l'ACP, indiquant une réponse orientée vers la survie cellulaire et le déclenchement d'une réponse globale au stress, comme l'indique par exemple la surexpression des facteurs de transcription *hif1* et *hsf1*. Ces facteurs de transcription sont activés en réponse à un large éventail de stress chimiques et contrôlent à eux deux l'expression de centaines de gènes dont les protéines de choc thermique (Silva et al. 2017; Steurer et al. 2018).

On voit très distinctement que les deux sites géographiques étudiés se différencient dès les premiers stades de développement, mais uniquement lors d'une exposition à une eau dopée en DBPs. Ces observations nécessitent une consolidation mais tendent à confirmer les observations de toxicité du chapitre 3 entre les larves de Fos et du site de référence après 48 heures post fécondation (hpf). En revanche, une exposition aigue (48 heures) à des concentrations environnementales (eau réelle de Fos) ne semble pas avoir d'impact. Les modalités de sélection du milieu semblent dépendre d'une exposition chronique.

Tableau 15 : Contribution des variables et des individus aux deux axes pour les expositions 48 hpf

Variables	Dim 1	cos2	ctr	Dim 2	ctr	cos2	Individus	Dim1	cos2	ctr	Dim2	cos2	ctr
MT1	0.453	0.190	1,69	0.892	11,9	0.796	Fos _ Eau de Fos	-3.738	0.784	31,25	-1.495	0.125	8,36
MT5	0.931	0.867	7,75	-0.359	1,93	0.129	Fos _ NOEC	4.821	0.791	51,97	-2.478	0.209	22,97
MT7	0.909	0.826	7,38	-0.198	0,58	0.039	Calvi _ Eau de Fos	-2.400	0.665	12,88	-0.300	0.010	0,337
ATPs	0.419	0.176	1,57	-0.908	12,32	0.824	Calvi _ NOEC	1.318	0.086	3,88	4.273	0.907	68,32
MADDL	0.826	0.682	6,10	-0.563	4,73	0.317							
TL	0.911	0.830	7,42	-0.412	2,54	0.170							
NRD1	0.892	0.795	7,11	-0.445	2,96	0.198							
BCI2	0.971	0.944	8,44	0.140	0,29	0.020							
NaK	0.297	0.088	0,79	0.718	7,72	0.516							
Hsf1	0.868	0.754	6,74	-0.493	3,64	0.243							
HSP60	0.748	0.559	5,00	-0.394	2,32	0.156							
DNMT3A	0.493	0.243	2,17	0.848	10,76	0.719							
Bax	0.415	0.172	1,54	0.887	11,78	0.787							
p53	0.995	0.989	8,85	-0.028	0,01	0.001							
Hif	0.985	0.970	8,67	-0.142	0,30	0.020							
p38	0.933	0.871	7,79	0.355	1,88	0.126							
DNAj	0.884	0.782	6,99	0.439	2,88	0.193							
GST	0.392	0.153	1,37	0.873	11,40	0.762							
SOD Mn	0.536	0.287	2,57	0.816	9,97	0.666							

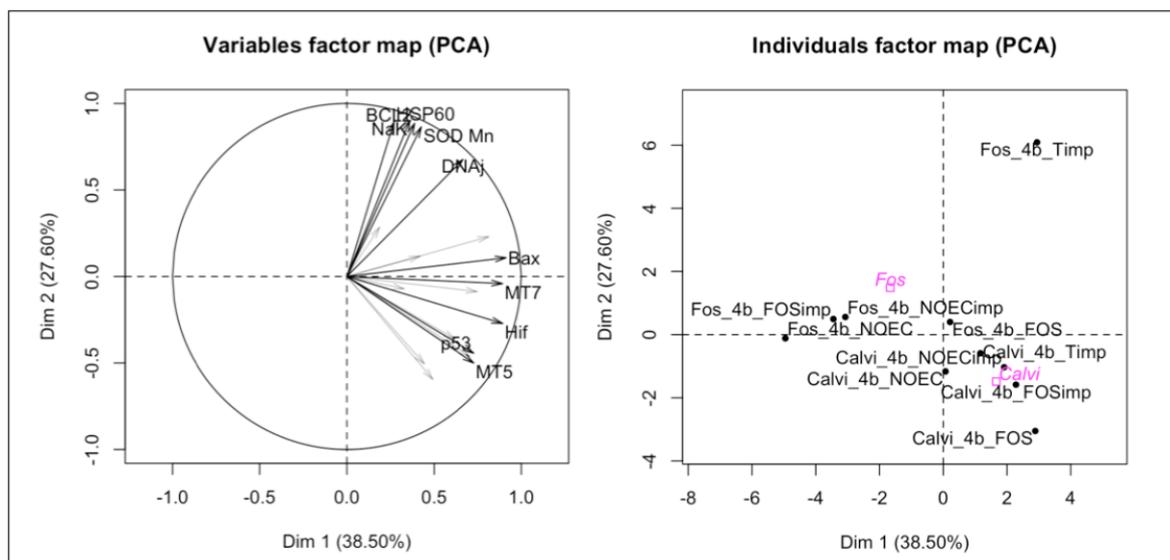


Figure 41 : Analyse en composantes principales du taux de transcrits des différents gènes (variables) et la répartition des individus en fonction de leur site géographique, après 96 hpf d'exposition à l'eau réelle de Fos et au cocktail de DBPs

Concernant le stade 4-bras (96 heures), les deux axes de l'ACP expliquent 66% de la variabilité. L'axe 1, qui explique 38,5% de la variabilité, est lié à la métallothionéine 7, aux facteurs de transcription hsf1 et hif et à bax. L'axe 2, qui explique 27,6% de la variabilité, regroupe les gènes bcl2, Na/K atpase, hsp 60 et sod[Mn], impliqués respectivement dans la régulation anti-apoptotique, l'équilibre sodium/potassium, le stress cellulaire et enfin la régulation des espèces réactives de l'oxygène (Tableau 16).

Ainsi, comparativement aux résultats obtenus pour le stade *Pluteus* (48 heures), la moitié seulement des gènes testés contribuent à expliquer la variabilité des réponses aux expositions chimiques. De plus, ces gènes séparent peu les différentes conditions d'exposition de leurs témoins (Figure 41). Les profils d'abondances des transcrits sont donc peu différents entre les différentes conditions, ce qui peut être interprété comme une moindre sensibilité des différentes populations, vis à vis des stress chimiques testés, à ce stade de développement. Cependant, lorsque l'on considère les populations indépendamment de l'intensité du stress, les profils de transcriptions apparaissent toutefois globalement opposés entre les deux populations, comme l'indiquent les deux barycentres (Figure 41).

Tableau 16 : Contribution des variables et des individus aux deux axes pour les expositions 96 hpf

Variables	Dim 1			Dim 2			Individus	Dim1			Dim2		
	cos2	ctr		cos2	ctr			cos2	ctr		cos2	ctr	
MT1	0.704	0.496	6,77	-0.461	0.212	4,04	Fos_ Eau de Fos	0.214	0.002	0,06	0.400	0.008	0,30
MT5	0.728	0.529	7,23	-0.500	0.250	4,77	Fos_ NOEC	-4.954	0.908	33,5	-0.119	0.001	0,02
MT7	0.893	0.797	10,8	-0.041	0.002	0,03	Fos_ Témoin imp	2.942	0.182	11,8	6.092	0.781	70,7
ATPs	0.618	0.382	5,21	-0.360	0.130	2,47	Fos_ Eau de Fos imp	-3.448	0.842	16,2	0.495	0.017	0,49
MADDL	0.419	0.175	2,39	0.117	0.014	0,26	Fos_ NOECimp	-3.073	0.669	12,9	0.559	0.022	0,59
TL	0.443	0.196	2,68	-0.504	0.254	4,85	Calvi_ Eau de Fos	2.887	0.281	11,3	-3.052	0.314	17,7
NRD1	0.327	0.107	1,46	-0.071	0.005	0,09	Calvi_ NOEC	0.071	0.001	0,007	-1.166	0.245	2,59
BCI2	0.387	0.150	2,05	0.885	0.783	14,9	Calvi_ Témoin imp	1.168	0.180	1,86	-0.590	0.046	0,66
NaK	0.361	0.130	1,77	0.903	0.815	15,5	Calvi_ Eau de Fos imp	2.282	0.437	7,11	-1.585	0.211	4,79
Hsf1	0.813	0.661	9,03	0.230	0.053	1,00	Calvi_ NOECimp	1.912	0.312	4,99	-1.034	0.091	2,03
HSP60	0.270	0.073	0,99	0.893	0.798	15,2							
DNMT3A	0.491	0.241	3,29	-0.594	0.353	6,73							
Bax	0.913	0.834	11,3	0.109	0.012	0,22							
p53	0.727	0.528	7,22	-0.443	0.196	3,74							
Hif	0.893	0.798	10,9	-0.271	0.074	1,40							
p38	0.747	0.557	7,61	-0.087	0.008	0,14							
DNAj	0.666	0.443	6,06	0.676	0.457	8,72							
GST	0.187	0.035	0,47	0.284	0.081	1,53							
SOD Mn	0.426	0.181	2,48	0.864	0.747	14,2							

L'effet de l'imprégnation n'est pas clairement visible dans notre expérience. L'effet positif de l'imprégnation précoce a déjà été rapporté par (Boyer 2006), chez des larves de moustiques soumises aux mêmes modalités d'imprégnation que nous. Ils ont constaté une sélection des larves avec des aptitudes accrues de détoxification. Dans notre cas, les larves témoins ayant subi une préexposition semblent sur-exprimer quelques gènes de gestion du stress. Notre résultat n'est que partiel et reste à valider, il se peut qu'une exposition précoce soit bénéfique plus tard, lors de la métamorphose par exemple (Scott 1996; Stevens et al. 2000; Fisher et al. 2003; Boyer 2006).

3.4. Influence de la nature de la pollution

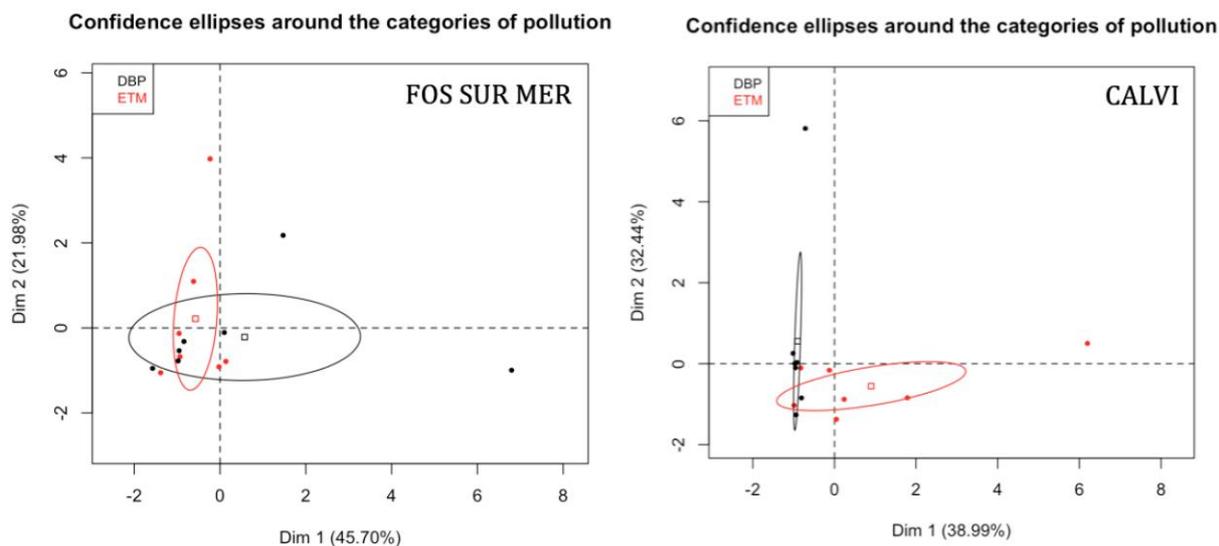
Ici, nous avons souhaité évaluer, en marge de notre étude sur les DBPs, la réponse aux stress métallique. Les larves des deux populations ont été exposées à des mélanges d'éléments traces métalliques dont la concentration était 5 et 10 fois plus importantes que les concentrations méditerranéennes moyennes (Tableau 10) (Richir 2012). Les résultats d'expression sont analysés par provenance des larves, avec les résultats obtenus pour les DBPs, de manière à révéler les différences de réponses vis à vis de la nature du stress (Figure 42). Chacune des deux ACP réalisées permet d'expliquer environ 70% de la variabilité d'expression observée, les gènes qui contribuent principalement à la constitution des axes sont présentés dans le tableau de la Figure 42.

L'ACP relative aux larves de Fos montre que les modalités de réponses transcriptomiques diffèrent peu selon la nature du stress, pour les concentrations les plus faibles, mises en évidence par la zone de chevauchement des ellipses. Des différences de réponses s'observent seulement lorsque le stress est de forte intensité (Figure 42). Ce résultat suggère que la régulation de l'expression des gènes étudiés n'est que peu affectée par la nature du stress, une réponse n'apparaissant qu'à la suite d'une exposition à un stress intense.

Au contraire, l'ACP réalisée avec les larves de Calvi montrent des profils de réponses transcriptomiques plus spécifiques de la nature du stress, dès les faibles intensités (ellipses très peu chevauchantes).

Si la différence de profil d'expression est une conséquence de l'adaptation au golfe de Fos, cela ne semble pas s'appliquer exclusivement aux DBPs. Dans l'ensemble, les différences observées ont fourni une indication supplémentaire de l'existence de

réactions d'adaptation locale chez les oursins de Fos. Pour les deux sites, on distingue une dispersion des niveaux d'expression importante, ce qui est en cohérence avec la forte plasticité phénotypique rapportée pour l'espèce (Ebert 1996).



Variables	FOS SUR MER				CALVI			
	Dim1	cos2	Dim2	cos2	Dim1	cos2	Dim2	cos2
MT1	-0,015	0,000	0,785	0,616	0,911	0,830	0,075	0,006
MT5	0,873	0,793	-0,028	0,001	0,921	0,849	0,066	0,004
MT7	0,187	0,035	0,086	0,007	0,484	0,234	-0,180	0,032
HSP60	0,098	0,010	0,923	0,851	0,914	0,836	-0,135	0,018
BCI2	0,352	0,124	0,371	0,138	0,712	0,508	0,687	0,472
Bax	0,707	0,500	0,480	0,230	-0,073	0,005	0,966	0,933
HIF	0,969	0,938	-0,069	0,005	0,315	0,100	-0,024	0,001
DNMT3A	0,928	0,862	-0,225	0,051	-0,049	0,002	0,946	0,896
p53	0,939	0,881	-0,282	0,080	-0,380	0,145	0,747	0,558

Figure 42 : Analyse en composante principale pour chaque site géographique en fonction de la pollution, ainsi que la contribution aux axes des variables

4. Conclusion

La compréhension de la plasticité physiologique des organismes en réponse aux différentes pressions anthropiques est devenue urgente à la lumière des changements globaux (Walther et al. 2002). Dans ce contexte, les organismes vivant dans des milieux variables comme le golfe de Fos sont des modèles idéaux pour élucider les mécanismes de la réponse cellulaire, car ils sont chroniquement exposés à un environnement stressant (Tomanek and Somero 1999; Somero 2002, 2010). Afin de comprendre les mécanismes d'adaptation à cet environnement, nous avons suivi ici la réponse transcriptionnelle des gènes codant pour les protéines clés impliquées dans la réponse au stress cellulaire chez les échinodermes.

Nos résultats montrent des différences claires de réponses transcriptomiques entre les deux populations, d'une part selon l'intensité de l'exposition et selon la nature de l'exposition. Il semble que les larves issues de Fos soient capables de répondre d'une manière univoque à différentes natures de stress chimiques, lorsque les concentrations sont environnementales. Il est possible que les larves aient été sélectionnées plus par le caractère multi-pollué, que par les DBPs spécifiquement. On peut de même s'interroger sur la variable environnementale la plus prépondérante dans l'éventuelle sélection, ou modifications des génomes.

Ces profils d'expressions peuvent résulter d'une sélection des génomes les plus aptes, par exemple à l'endroit de séquences régulatrices de l'expression des gènes. Toutefois, les différences de patron d'expression peuvent être sous la dépendance de signaux épigénétiques acquis à la suite de l'exposition à l'eau du golfe. Il s'agira, dans de futures expériences, de confirmer nos premières observations, et de tester l'hypothèse que la sélection des larves par les métaux confère simultanément une meilleure résistance aux DBPs, et réciproquement.

Enfin il faudra caractériser les changements génomiques et ou épigénétiques (méthylation de l'ADN) potentiellement à l'origine des différents profils d'expression. Ces travaux ont été initiés à la fin de ce travail de thèse et n'ont pu être que partiellement traités.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a apporté des nouvelles connaissances concernant l'état de la pollution océanique en sous-produits de chloration, et l'impact de l'exposition chronique aux DBPs sur les organismes côtiers.

Le golfe de Fos nous a servi de modèle d'étude pour évaluer l'impact de la pollution chlorée en mer, dans un contexte de multi-pollution. Un niveau de sous-produits de chloration de l'ordre de la dizaine de microgrammes par litre a été mesuré. Les points les plus impactés, sans surprise, sont les plus proches des rejets industriels, l'effet de dilution vers le large apparaît suffisant pour qu'en sortie du golfe, la pollution ne dépasse pas des concentrations de l'ordre du nanogramme par litre, quelles que soient les conditions météorologiques testées. L'impact des rejets est donc essentiellement côtier.

Sur le volet « chimie », notre travail a permis de révéler la similitude de composition, pour les grandes familles de DBPs, entre eaux douces et eaux marines, avec une composante bromée pour les eaux marines. On y retrouve les trihalométhanes, les acides haloacétiques et les haloacétonitriles. La famille des halophénols est problématique, car ce sont les composés les plus lipophiles qui peuvent donc rentrer dans la chaîne alimentaire. Seul le 2,4,6 tribromophénol a été retrouvé dans l'eau et dans les sédiments, mais pas systématiquement au niveau des points de prélèvement les plus proches des rejets. Ces résultats laissent penser qu'il y ait soit une autre source, naturelle ou anthropique, en halophénols, soit que le temps de formation des phénols est globalement plus lent et c'est pour cette raison qu'il n'existe pas de corrélation entre la pollution et les rejets chlorés. Ces hypothèses semblent confortées par les analyses in vivo des halophénols dans les oursins, qui n'a pas non plus permis de corréler les concentrations en halophénols dans les gonades avec la proximité géographique des rejets.

Sur le volet « biologie », nous avons démontré que les trois principales molécules bromées retrouvées dans les différentes matrices du golfe (i.e. le bromoforme, l'acide

tribromoacétique et le 2,4,6 tribromophénol) étaient impactantes à des concentrations de l'ordre du milligramme par litre, soit mille fois les concentrations retrouvées aux exutoires, et un million de fois les concentrations retrouvées au large du golfe.

Alors que ces concentrations suggèrent un impact limité de l'eau du golfe sur les organismes vivants, nous avons toutefois démontré une tolérance au bromoforme chez les larves issues d'oursins adultes prélevés dans le golfe de Fos, comparativement à des larves issues d'adultes vivant en zone non polluée. Cela indique que les populations du golfe de Fos se sont probablement adaptées pour contrer les effets de l'exposition chronique à la multi-pollution du golfe, ce qui nuance clairement les résultats d'écotoxicologie obtenus. Sans toutefois caractériser tout à fait la nature de la sélection agissant sur les populations de Fos, nos travaux sur la régulation de l'expression de gènes indique des modalités de réponses populations spécifiques, vis-à-vis de la nature et de l'intensité du stress chimique. L'environnement du golfe exerce donc une sélection des individus, probablement précocement au cours de la phase larvaire pélagique.

Notre étude transcriptomique a de plus mis en lumière que les gènes les plus discriminants parmi ceux choisis sont ceux codant pour les métallothionéines, impliqués dans la détoxification métallique. Ainsi, il est donc possible que l'adaptation locale résulte de la multi-contamination en métaux, en hydrocarbures (HAP) en composés aromatique organochlorés (PCB) et que la résistance au bromoforme soit un effet associé. Cette hypothèse devra être testée en utilisant d'autres cibles moléculaires permettant de mieux évaluer les influences relatives des métaux entre autres et des DBPs dans la résistance aux DBPs. Quoi qu'il en soit, nous observons dans les faits une « multi-résistance » des individus de Fos.

En conclusion, les DBPs présents dans le golfe, liés aux rejets industriels, ne semblent pas avoir d'effet toxique aigu, ni d'effet sur le fonctionnement de l'écosystème global. La distribution planctonique est en effet régie par les nutriments et les paramètres physico-chimiques, et il existe une macrofaune locale abondante, sauvage et d'élevage sans surmortalité rapportée. Si l'on fait un petit aparté sur quelques données de santé publique, l'agence environnementale norvégienne indique que la concentration la plus élevée en 2,4,6 tribromophénol qui n'induit pas encore d'effet délétère sur les cellules humaines est de 1 mg/kg/j (Norwegian Environment Agency 2012). Si l'on considère par exemple la consommation des gonades d'oursins, qui contiennent en moyenne 100µg/kg de TBP, il faudrait donc en consommer 10 kg pour atteindre cette valeur.

Sachant que les gonades d'oursins représentent environ 10% du poids total, que les oursins comestibles pèsent environ 60g, 6g sont consommables pour un individu. Il faudrait donc consommer environ 1600 oursins par jour pour atteindre un seuil à la limite du danger. Bien sûr, ces calculs sont indicatifs, étant donné qu'ils ne prennent en compte qu'une seule source et uniquement le tribromophénol et non le cocktail de polluants présents dans le golfe, mais ils permettent de relativiser les concentrations retrouvées en DBPs, pour la consommation humaine de fruits de mer.

En revanche, plusieurs indices clairs montrent que les oursins sont adaptés au bromoforme, ce qui indique qu'il existe une pression de sélection du milieu sur le vivant. Il reste encore à établir que cette résistance acquise au bromoforme résulte bien de l'exposition aux DBPs. En première interprétation, nos résultats sont plus en faveur d'un stress métallique, tout à fait compatible avec les activités industrielles du golfe, et cohérent avec les concentrations en métaux observées dans le golfe.

A l'issue de cette thèse, des résultats novateurs ont donc été obtenus, et nécessiteront de poursuivre les investigations.

D'une part, pour continuer à évaluer le niveau de contamination du golfe en composés organohalogénés industriels il s'agira de développer des méthodes d'extraction permettant de concentrer davantage les échantillons. L'utilisation de capteur passif est actuellement en cours et permettra d'accéder à des flux et DBPs et non plus à des concentrations ponctuelles. Cela permettra en GC-ECD de mesurer des nanogrammes voire picogrammes de polluants et de détecter des molécules encore jamais mesurées dans le milieu marin qui peuvent avoir un potentiel toxique différent. Mais également en changeant de technique analytique, avec un FT-ICR-MS (Fourier-Transform Ion-Cyclotron-Resonance Mass Spectrometry), il serait possible d'identifier des organohalogénés de plus haut poids moléculaire. Ces derniers pourraient jouer un rôle important dans le pourcentage des composés organohalogénés totaux mesurés par EDF lors de la première campagne.

Également, il est important de doser la pollution en DBPs dans des gonades d'oursin issus d'un site de référence. Ces analyses permettraient de comparer les valeurs obtenues dans le golfe de Fos afin d'en conclure un niveau de pollution.

D'autre part, les résultats d'écotoxicologie et de biologie moléculaire devront être poursuivis pour mieux caractériser les modalités de réponses au stress, en particulier à

l'eau réelle du golfe versus une eau d'un site non pollué. Dans cette optique la comparaison de la réponse à l'échelle populationnelle a permis d'obtenir des résultats intéressants, et il s'agira d'augmenter le panel de gènes candidats, notamment des gènes impliqués dans la « prise en charge » des DBPs par les larves.

La prise en compte des variabilités de réponses individuelles intra-populations, permettra de plus de visualiser les gènes dont la régulation de l'expression est sous l'effet de la pression de l'environnement du golfe (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 1994; Picard and Schulte 2004; Pespeni et al. 2012). Selon cette hypothèse, on devrait observer une faible variabilité de niveau d'expression inter-individuelle et une forte variabilité inter-population. La pression de sélection sur les séquences régulatrices devra ensuite être évaluée en comparant les séquences régulatrices obtenues de différents individus exposés et non exposés. La comparaison des séquences et des statuts de méthylation permettra de lever les incertitudes sur les modalités d'adaptations ou d'acclimatation au milieu (mutation *versus* méthylation). Sur la base des résultats déjà obtenus, nous avons commencé à tester cette hypothèse sur les promoteurs des métallothionéines. Le génome étant séquencé mais non annoté, la reconstitution des séquences promotrices est pour l'instant réalisée par bio-informatique. La caractérisation de la région régulatrice permettra, au préalable à la comparaison des séquences inter-individuelles, d'identifier les éléments régulateurs et les éventuels sites de méthylation.

Sur le plan de l'expression, une approche transcriptome global pourrait être envisagé ce qui permettrait d'avoir une vision intégrée des processus impliqués dans l'acclimatation/adaptation au stress de Fos. Cependant, les coûts de séquençage demeurent encore importants, compte-tenu du nombre d'échantillons qu'il faudrait considérer.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons envisagé une approche génomique globale (RADseq), pour tenter d'identifier d'éventuelles régions génomiques sous sélections, qui pourraient valider l'hypothèse d'adaptation locale (Manel et al. 2016). Dans cette optique, 30 individus adultes de Fos, et 60 individus provenant d'autres sites non pollués ont été séquencés. Les données brutes ont été récemment reçues. A ce jour les fragments RAD ont été alignés sur un génome de référence (mis à disposition par le laboratoire de biologie du développement de l'Observatoire Océanologique de Villefranche-sur-mer). L'analyse de ces marqueurs est actuellement en cours. Bien que

cette approche soit prometteuse (Laporte et al. 2016; Catchen et al. 2017), la détection des régions sous sélection n'est pas toujours possible (Pratlong et al. 2018).

Enfin, les modalités d'adaptation à l'environnement dépendent de mécanismes complexes et largement interconnectés, ce qui rend la compréhension des phénomènes difficiles. L'essor des méthodes globales permet d'étudier ces différents angles moléculaires : génomiques, transcriptomiques et épigénomiques, qui ensemble devraient permettre de mieux comprendre la dynamique du maintien de diversité génétique et de la plasticité phénotypiques des organismes (Bernatchez 2016), leur permettant de coloniser toutes sortes d'habitats, dont on souhaite finalement qu'ils leur soient le plus favorable possible.

BIBLIOGRAPHIE

- Abarnou A, Miossec L (1992) Chlorinated waters discharged to the marine environment chemistry and environmental impact. An overview. *Science of The Total Environment* 126:173–197. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(92\)90490-J](https://doi.org/10.1016/0048-9697(92)90490-J)
- Abdel-Naim AB, Nagy AA, Mohamadin AM, et al (2009) Chloroacetonitrile induces oxidative stress and apoptosis in mouse fetal liver. *Toxicology Letters* 190:123–127. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.06.867>
- Abdullah MI, Royle LG, Morris AW (1972) Heavy Metal Concentration in Coastal Waters. *Nature* 235:158–160. <https://doi.org/10.1038/235158a0>
- Adb el baky H, El-Baz F, El baroty G (2009) Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects in vitro toward hepatotoxicity model. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 3:133–139
- Agus E, Sedlak D (2009) Formation and fate of chlorination by-products in reverse osmosis desalination systems. *Water research* 44:1616–26. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.11.015>
- Akcha F, Vincent-hubert F, Leszkowicz A (2003) Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutation research* 534:21–32. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00244-9](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00244-9)
- Allonier A-S, Khalanski M, Camel V, Bermond A (1999) Determination of dihaloacetonitriles and halophenols in chlorinated sea water. *Talanta*
- Almqvist U (2011) Persistence and bioaccumulation of high volume chemicals in articles in sweden. *Departement of Materials and Environmental Chemistry*
- Alquezar R, Glendenning L, Costanzo S (2013) The use of the brown macroalgae, *Sargassum flavicans*, as a potential bioindicator of industrial nutrient enrichment. *Marine Pollution Bulletin* 77:140–146. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.10.013>
- Amiard J, Amiardtriquet C, Barka S, et al (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76:160–202. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.015>
- Amiard-Triquet C, Rainglet F, Larroux C, et al (1998) Metallothioneins in Arctic Bivalves. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41:96–102. <https://doi.org/10.1006/eesa.1998.1673>
- Ammar KB (2018) Etude des réponses de la moule *Mytilus* spp exposée à des stress métallique et thermique durant les stades embryo-larvaires

- Amri S, Samar M-F, Sellem F, Ouali K (2017) Seasonal antioxidant responses in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816) used as a bioindicator of the environmental contamination in the South-East Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin* 122:392–402. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.079>
- Andersen AT, Dommasnes A, Hesthagen IH (1973) Some heavy metals in sprat (*Sprattus sprattus*) and herring (*Clupea harengus*) from the inner Oslofjord. *Aquaculture* 2:17–22. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(73\)90121-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(73)90121-X)
- Arfi R (1984) Gulf of Fos (France): Main hydrological features (1976–1978). *Hydrobiologia* 118:187–197. <https://doi.org/10.1007/BF00021042>
- ARS (2017) La qualité de l'eau du robinet en France. *Environnement et santé*
- Asimov I, Pohl F (1991) *Our Angry Earth*, New York: Tor
- Augier H, Desmerger R, Egèa M, et al (1994) Etude de la pollution par les métaux lourds de la zone industrialo-portuaire du golfe de Fos-sur-Mer (Méditerranée, France), à l'aide de bio-indicateurs (moules et oursins). *Marine Life*
- Ávila SP, Cordeiro R, Madeira P, et al (2018) Global change impacts on large-scale biogeographic patterns of marine organisms on Atlantic oceanic islands. *Marine Pollution Bulletin* 126:101–112. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.087>
- Bartell S (2006) Biomarkers, Bioindicators, and Ecological Risk Assessment - A Brief Review and Evaluation. *Environmental Bioindicators* 1:60–73. <https://doi.org/10.1080/15555270591004920>
- Barton BA (2002) Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integr Comp Biol* 42:517–525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>
- Barton BA, Iwama GK (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 1:3–26. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90019-G](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90019-G)
- Baudrimont M, Andres S, Durrieu G, Boudou A (2003) The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. *Aquatic Toxicology* 63:89–102. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00134-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00134-0)
- Bebianno MJ, Langston WJ (1998) Cadmium and metallothionein turnover in different tissues of the gastropod *Littorina littorea*. *Talanta* 46:301–313. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(97\)00344-5](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(97)00344-5)
- Bebianno MJ, Machado LM (1997) Concentrations of metals and metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the south coast of Portugal. *Marine Pollution Bulletin* 34:666–671. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(97\)00036-2](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(97)00036-2)
- Beddowes EJ, Faux SP, Chipman JK (2003) Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative

- stress. *Toxicology* 187:101–115. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00058-1)
- Behrenfeld MJ, O'Malley RT, Siegel DA, et al (2006) Climate-driven trends in contemporary ocean productivity. *Nature* 444:752–755. <https://doi.org/10.1038/nature05317>
- Bellar TA, Lichtenberg JJ, Kroner RC (1974) The Occurrence of Organohalides in Chlorinated Drinking Waters. *Journal - AWWA* 66:703–706. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1974.tb02129.x>
- Bennett A (2013) 50th Anniversary: Desalination: 50 years of progress. *Filtration + Separation* 50:32–34, 36–39. [https://doi.org/10.1016/S0015-1882\(13\)70128-9](https://doi.org/10.1016/S0015-1882(13)70128-9)
- Benon P, Blanc F, Bourgade B, et al (1978) Distribution of some heavy metals in the Gulf of Fos. *Marine Pollution Bulletin* 9:71–75. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(78\)90452-6](https://doi.org/10.1016/0025-326X(78)90452-6)
- Bernatchez L (2016) On the maintenance of genetic variation and adaptation to environmental change: considerations from population genomics in fishes: genetic variation and adaptive potential in fishes. *J Fish Biol* 89:2519–2556. <https://doi.org/10.1111/jfb.13145>
- Bird A (2007) Perceptions of epigenetics. In: *Nature*. <https://www.nature.com/articles/nature05913>. Accessed 27 Sep 2019
- Bonanno G, Orlando-Bonaca M (2018) Perspectives on using marine species as bioindicators of plastic pollution. *Marine Pollution Bulletin* 137:209–221. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.018>
- Bonanno G, Pavone P (2015) Leaves of *Phragmites australis* as potential atmospheric biomonitors of Platinum Group Elements. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 114:31–37. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.01.005>
- Bonanno G, Raccuia SA (2018) Comparative assessment of trace element accumulation and bioindication in seagrasses *Posidonia oceanica*, *Cymodocea nodosa* and *Halophila stipulacea*. *Marine Pollution Bulletin* 131:260–266. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.039>
- Bonato S, Breton E, Didry M, et al (2016) Spatio-temporal patterns in phytoplankton assemblages in inshore–offshore gradients using flow cytometry: A case study in the eastern English Channel. *Journal of Marine Systems* 156:76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2015.11.009>
- Bonato S, Christaki U, Lefebvre A, et al (2015) High spatial variability of phytoplankton assessed by flow cytometry, in a dynamic productive coastal area, in spring: the eastern English Channel. *Estuarine Coastal And Shelf Science* 154:214–223. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.12.037>
- Bonaventura R, Zito F, Chiaramonte M, et al (2018) Nickel toxicity in *P. lividus* embryos: Dose dependent effects and gene expression analysis. *Marine Environmental Research* 139:113–121. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.05.002>

- Bonaventura R, Zito F, Costa C, et al (2011) Stress response gene activation protects sea urchin embryos exposed to X-rays. *Cell Stress Chaperones* 16:681–687. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0277-3>
- Bonsignore M, Salvagio Manta D, Mirto S, et al (2018) Bioaccumulation of heavy metals in fish, crustaceans, molluscs and echinoderms from the Tuscany coast. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 162:554–562. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.044>
- Boudjellaba D, Dron J, Revenko G, et al (2016) Chlorination by-product concentration levels in seawater and fish of an industrialised bay (Gulf of Fos, France) exposed to multiple chlorinated effluents. *Science of The Total Environment* 541:391–399. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.046>
- Boudouresque C, Verlaque M (2007) Chapter 13 Ecology of *Paracentrotus lividus*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* 37:243–285. [https://doi.org/10.1016/S0167-9309\(07\)80077-9](https://doi.org/10.1016/S0167-9309(07)80077-9)
- Boughriet R (2011) Pollutions en mer Méditerranée : “ un point de non-retour à l'échéance 2030”
- Boumela I, Assou S, Aouacheria A, et al (2011) Involvement of BCL2 family members in the regulation of human oocyte and early embryo survival and death: gene expression and beyond. *Reproduction* 141:549–561. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0504>
- Boyer S (2006) Résistance Métabolique des Larves de Moustiques aux Insecticides : Conséquences Environnementales
- Boyle JL, Lindsay RC, Stuiber D (2006) Bromophenol Distribution in Salmon and Selected Seafoods of Fresh- and Saltwater Origin. *Journal of Food Science* 57:918–922. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb14323.x>
- Boyle JL (University of W-M, Lindsay RC, Stuiber DA (1992) Contributions of bromophenols to marine-associated flavors of fish and seafoods. *Journal of aquatic food product technology (USA)*
- Bozinovic F, Orellana MJM, Martel SI, Bogdanovich JM (2014) Testing the heat-invariant and cold-variability tolerance hypotheses across geographic gradients. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 178:46–50. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.08.009>
- Bozinovic G, Oleksiak MF (2011) Genomic approaches with natural fish populations from polluted environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30:283–289. <https://doi.org/10.1002/etc.403>
- Brennan RS, Hwang R, Tse M, et al (2016) Local adaptation to osmotic environment in killifish, *Fundulus heteroclitus*, is supported by divergence in swimming performance but not by differences in excess post-exercise oxygen consumption or aerobic scope. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 196:11–19. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.02.006>

- Buitenhuis ET, Li WKW, Vaultot D, et al (2012) Picophytoplankton biomass distribution in the global ocean. *Earth System Science Data* 4:37–46
- Burger J (2006) Bioindicators: Types, Development, and Use in Ecological Assessment and Research. *Environmental Bioindicators* 1:22–39.
<https://doi.org/10.1080/15555270590966483>
- Butler JH, King DB, Lobert JM, et al (2007) Oceanic distributions and emissions of short-lived halocarbons. *Global Biogeochemical Cycles* 21:.
<https://doi.org/10.1029/2006GB002732>
- 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. In: *In Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. Boca, pp 1–42
- Cabrita MT, Vale C, Rauter A (2010) Halogenated Compounds from Marine Algae. *Marine drugs* 8:2301–17. <https://doi.org/10.3390/md8082301>
- Caçador I, Costa JL, Duarte B, et al (2012) Macroinvertebrates and fishes as biomonitors of heavy metal concentration in the Seixal Bay (Tagus estuary): Which species perform better? *Ecological Indicators* 19:184–190.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.09.007>
- Calza P, Massolino C, Pelizzetti E, Minero C (2008) Solar driven production of toxic halogenated and nitroaromatic compounds in natural seawater. *Science of The Total Environment* 398:196–202.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.03.023>
- Calza P, Maurino V, Minero C, et al (2005) Photoinduced halophenol formation in the presence of iron(III) species or cadmium sulfide. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 170:61–67.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2004.07.003>
- Campos C, Valente LMP, Fernandes JMO (2012) Molecular evolution of zebrafish dnmt3 genes and thermal plasticity of their expression during embryonic development. *Gene* 500:93–100. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.03.041>
- Carballeira C, De Orte MR, Viana IG, et al (2012) Assessing the toxicity of chemical compounds associated with land-based marine fish farms: the sea urchin embryo bioassay with *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*. *Arch Environ Contam Toxicol* 63:249–261. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9769-0>
- Carignan V, Villard M-A (2002) Selecting Indicator Species to Monitor Ecological Integrity: A Review. *Environ Monit Assess* 78:45–61.
<https://doi.org/10.1023/A:1016136723584>
- Caroppo C, Stabili L, Aresta M, et al (2006) Impact of heavy metals and PCBs on marine picoplankton. *Environmental toxicology* 21:541–51.
<https://doi.org/10.1002/tox.20215>

- Carpenter L, Liss P (2000) On temperate sources of bromoform and other reactive organic bromine gases. *Journal of Geophysical Research* 105:20539–20548. <https://doi.org/10.1029/2000JD900242>
- Catchen J, Hohenlohe P, Bernatchez L, et al (2017) Unbroken: RADseq remains a powerful tool for understanding the genetics of adaptation in natural populations. *Molecular Ecology Resources* 17:. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12669>
- Cemeli E, Wagner ED, Anderson D, et al (2006) Modulation of the cytotoxicity and genotoxicity of the drinking water disinfection byproduct iodoacetic acid by suppressors of oxidative stress. *Environ Sci Technol* 40:1878–1883. <https://doi.org/10.1021/es051602r>
- Chan JP, Cheung MT, Li FP (1974) Trace metals in Hong Kong waters. *Marine Pollution Bulletin* 5:171–174. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(74\)90131-3](https://doi.org/10.1016/0025-326X(74)90131-3)
- Chauveau L (2017) Les eaux de ballast des navires seront enfin dépolluées. *Sciences avenir*
- Chester R, Stoner JH (1974) The distribution of zinc, nickel, manganese, cadmium, copper, and iron in some surface waters from the world ocean. *Marine Chemistry* 2:17–32. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(74\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0304-4203(74)90003-6)
- Chinn R, Lee T, Krasner S, et al (2007) Solid-Phase Extraction of 35 DBPs with Analysis by GC/ECD and GC/MS. *Proceedings of the American Water Works Association Water Quality Technology Conference*
- Chung HY, Joyce Ma WC, Kim J-S (2003) Seasonal Distribution of Bromophenols in Selected Hong Kong Seafood. *J Agric Food Chem* 51:6752–6760. <https://doi.org/10.1021/jf034632r>
- Cillard J, Cillard P (2006) Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations
- Cimetiere N, Dossier-Berne F, De Laat J (2010) Effect of some parameters on the formation of chloroform during chloramination of aqueous solutions of resorcinol. *Water Research* 44:4497–4504. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.010>
- Coclet C, Garnier C, Delpy F, et al (2018) Trace metal contamination as a toxic and structuring factor impacting ultraphytoplankton communities in a multicontaminated Mediterranean coastal area. *Progress in Oceanography* 163:196–213. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2017.06.006>
- Coillie R van, Couture P, Visser SA (1983) Use of Algae in aquatic ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*
- Copete ML, Zalacain A, Lorenzo C, et al (2011) Occurrence of haloanisole and halophenol contamination in aged red wines. *Food Additives and Contaminants* 22

- Costet-Deiber N Effets sanitaires de l'exposition aux sous-produits de chloration de l'eau. 278
- Covaci A, Harrad S, Abdallah MA-E, et al (2011) Novel brominated flame retardants: A review of their analysis, environmental fate and behaviour. *Environment International* 37:532–556. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.11.007>
- Cunha SC, Pena A, Fernandes JO (2017) Mussels as bioindicators of diclofenac contamination in coastal environments. *Environmental Pollution* 225:354–360. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.02.061>
- Damiens G, Mouneyrac C, Quiniou F, et al (2006) Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*. *Environmental Pollution* 140:492–499. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.08.006>
- Debrincat R (2017) Les navires tenus de traiter leurs eaux de ballast. *Actu-Environnement*
- Delacroix S, Vogelsang C, Tobiesen A, Liltved H (2013) Disinfection by-products and ecotoxicity of ballast water after oxidative treatment – Results and experiences from seven years of full-scale testing of ballast water management systems. *Marine Pollution Bulletin* 73:24–36. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.06.014>
- Delunardo FAC, Carvalho LR de, Silva BF da, et al (2015) Seahorse (*Hippocampus reidi*) as a bioindicator of crude oil exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 117:28–33. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.016>
- Deng J, Liu C, Yu L, Zhou B (2010) Chronic exposure to environmental levels of tribromophenol impairs zebrafish reproduction. *Toxicology and Applied Pharmacology* 243:87–95. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.11.016>
- Depledge MH, Aagaard A, Györkös P (1995) Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin* 31:19–27. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(95\)00006-9](https://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00006-9)
- Devaux A, Pesonen M, Monod G (1997) Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 11:71–79. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(97\)00004-0](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(97)00004-0)
- Dinnel PA, Link JM, Stober QJ (1987) Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters. *Arch Environ Contam Toxicol* 16:23–32. <https://doi.org/10.1007/BF01055356>
- Dirrigl FJ, Badaoui Z, Tamez C, et al (2018) Use of the sea hare (*Aplysia fasciata*) in marine pollution biomonitoring of harbors and bays. *Marine Pollution Bulletin* 129:681–688. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.056>
- Domino MM, Pepich BV, Munch DJ, Fair PS (2004) Optimizing the determination of haloacetic acids in drinking waters. *Journal of Chromatography A* 1035:9–16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.02.034>

- Dorts J, Falisse E, Schoofs E, et al (2016) DNA methyltransferases and stress-related genes expression in zebrafish larvae after exposure to heat and copper during reprogramming of DNA methylation. *Sci Rep* 6:1–10. <https://doi.org/10.1038/srep34254>
- Dupont S, Thorndyke MC (2009) Impact of CO₂-driven ocean acidification on invertebrates early life-history – What we know, what we need to know and what we can do. *Biogeosciences Discuss* 6:3109–3131. <https://doi.org/10.5194/bgd-6-3109-2009>
- Ebert TA (1996) Adaptive aspects of phenotypic plasticity in echinoderms
- Eppley RW (1972) Eppley R W. Temperature and phytoplankton growth in the sea. *Fish. Bull. Nat. Ocean. Atmos. Adm.* 70:1063-85, 1972
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81–128. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)
- Evans TG, Watson-Wynn P (2014) Effects of Seawater Acidification on Gene Expression: Resolving Broader-Scale Trends in Sea Urchins. *The Biological Bulletin* 226:237–254. <https://doi.org/10.1086/BBLv226n3p237>
- Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P (1998) Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* 281:237–240. <https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237>
- Fisher T, Crane M, Callaghan A (2003) Induction of cytochrome P-450 activity in individual *Chironomus riparius* Meigen larvae exposed to xenobiotics. *Ecotoxicol Environ Saf* 54:1–6. [https://doi.org/10.1016/s0147-6513\(02\)00031-3](https://doi.org/10.1016/s0147-6513(02)00031-3)
- Fisk PR, Girling AE, Wildey RJ (2010) Prioritisation of flame retardants for environmental risk assessment. UK Environment Science Agency
- Fox-Kemper B, Adcroft A, Böning CW, et al (2019) Challenges and Prospects in Ocean Circulation Models. *Front Mar Sci* 6:. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00065>
- Freile-Pelegrin Y, Robledo D (2014) Bioactive phenolic compounds from algae. *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources* 113–129
- Frenzilli G, Nigro M, Lyons BP (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 681:80–92. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.001>
- Fukai R, Huynh-Ngoc L (1976) Copper, zinc and cadmium in coastal waters of the N.W. Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin* 7:9–13. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(76\)90281-2](https://doi.org/10.1016/0025-326X(76)90281-2)
- Galasso C, D’Aniello S, Sansone C, et al (2019) Identification of Cell Death Genes in Sea Urchin *Paracentrotus lividus* and Their Expression Patterns during Embryonic Development. *Genome Biology and Evolution* 11:586–596. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz020>

- García-Seoane R, Fernández JA, Villares R, Aboal JR (2018) Use of macroalgae to biomonitor pollutants in coastal waters: Optimization of the methodology. *Ecological Indicators* 84:710–726. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.09.015>
- GESAMP-BWWG (2018) Harmful aquatic organisms in ballast water. Marine environment protection committee
- Gharred T, Jebali J, Belgacem M, et al (2016) Assessment of the individual and mixture toxicity of cadmium, copper and oxytetracycline, on the embryo-larval development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environmental Science and Pollution Research* 23:18064–18072. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6988-3>
- Gibson C, Tone F, Wilkinso P, Blaylock JW (2008) Toxicity And Effects Of Bromoform On Five Marine Species. *Ozone-science & Engineering - OZONE-SCI ENG* 1:47–54. <https://doi.org/10.1080/01919517908550831>
- Golder Expertise (2009) Suivi environnemental di milieu marin - Etat zéro
- Goldstone JV, Hamdoun A, Cole BJ, et al (2006) The chemical defensesome: Environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. *Developmental Biology* 300:366–384. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.066>
- González J, Figueiras FG, Aranguren-Gassis M, et al (2009) Effect of a simulated oil spill on natural assemblages of marine phytoplankton enclosed in microcosms. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 83:265–276. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.04.001>
- Gosselin L, Qian P-Y (1997) Juvenile mortality in benthic marine invertebrates. *Marine Ecology Progress Series* 146:265–282. <https://doi.org/10.3354/meps146265>
- Gribble GW (2010) Naturally Occurring Organohalogen Compounds - A Comprehensive Update. Springer-Verlag, Wien
- Grossman AR, Mackey KRM, Bailey S (2010) A Perspective on Photosynthesis in the Oligotrophic Oceans: Hypotheses Concerning Alternate Routes of Electron Flow¹. *Journal of Phycology* 46:629–634. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00852.x>
- Gude VG (2016) Desalination and sustainability – An appraisal and current perspective. *Water Research* 89:87–106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.11.012>
- Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS, et al (2014) OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology* 2:457–465. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.020>
- Hagger JA, Atienzar FA, Jha AN (2005) Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 74:205–217. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.05.013>

- Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, et al (2007) Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*
- Hanasaki N, Yoshikawa S, Kakinuma K, Kanae S (2016) A seawater desalination scheme for global hydrological models. *Hydrology and Earth System Sciences* 20:4143–4157. <https://doi.org/10.5194/hess-20-4143-2016>
- Hanigan D, Truong L, Simonich M, et al (2017) Zebrafish embryo toxicity of 15 chlorinated, brominated, and iodinated disinfection by-products. *Journal of Environmental Sciences* 58:302–310. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.008>
- Hansen KMS, Willach S, Antoniou MG, et al (2012) Effect of pH on the formation of disinfection byproducts in swimming pool water--is less THM better? *Water Res* 46:6399–6409. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.008>
- Harju M, Heimstad ES, Herzke D, et al (2009) Emerging “new” Brominated flame retardants in flame retarded products and the environment. Norwegian Pollution Control Authority
- Hartmann P, Bordet F, Chevalier C, et al (2011) Centrales nucléaires et environnement - Prélèvements d’eau et rejets. EDP Science. https://doi.org/10.26530/OAPEN_519657
- Hellawell JM (ed) (1986) *Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management*. Biological indicators of freshwater pollution and environmental management
- Heller-Grossman L, Manka J, Limoni-Relis B, Rebhun M (2001) THM, haloacetic acids and other organic DBPs formation in disinfection of bromide rich Sea of Galilee (Lake Kinneret) water. *Water Science and Technology: Water Supply* 1:259–266. <https://doi.org/10.2166/ws.2001.0046>
- Hernandez MR, Ismail N, Drouillard KG, MacIsaac HJ (2017) Ships’ Ballast Water Treatment by Chlorination Can Generate Toxic Trihalomethanes. *Bull Environ Contam Toxicol* 99:194–199. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2125-3>
- Hess-Erga O-K, Moreno-Andrés J, Enger Ø, Vadstein O (2019) Microorganisms in ballast water: Disinfection, community dynamics, and implications for management. *Science of The Total Environment* 657:704–716. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.004>
- Hladik ML, Focazio MJ, Engle M (2014) Discharges of produced waters from oil and gas extraction via wastewater treatment plants are sources of disinfection by-products to receiving streams. *Science of The Total Environment* 466–467:1085–1093. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.008>
- Hodgeson JW, Cohen AL, Munch DJ (1990) Determination of chlorination disinfection byproducts, chlorinated solvents, and halogenated pesticides/herbicides in drinking water by liquid-liquid extraction and gas chromatography with electron capture detection. 61

- Holt E, Miller S (2010) Bioindicators: Using Organisms to Measure Environmental Impacts | Learn Science at Scitable. Nature Education
- Hornsey IS, Hide D (1985) The production of antimicrobial compounds by British marine algae. IV. Variation of antimicrobial activity with algal generation. *British Phycological Journal* 20:21–25. <https://doi.org/10.1080/00071618500650041>
- Hose JE (1985) Potential uses of sea urchin embryos for identifying toxic chemicals: Description of a bioassay incorporating cytologic, cytogenetic and embryologic endpoints. *Journal of Applied Toxicology* 5:245–254. <https://doi.org/10.1002/jat.2550050406>
- Hwang J, Park SY, Lee S, Lee T-K (2018) High diversity and potential translocation of DNA viruses in ballast water. *Marine Pollution Bulletin* 137:449–455. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.053>
- INERIS (2001) Systèmes de refroidissement industriels
- Jacangelo JG, Trussell RR (2002) International report: water and wastewater disinfection - trends, issues and practices. *Water Science and Technology: Water Supply* 2:147–157. <https://doi.org/10.2166/ws.2002.0097>
- Jenner H, Whitehouse J, Taylor C, Khalanski M (1998) Cooling Water Management in European Power Stations: Biology and Control. http://dx.doi.org/101051/hydro:1989101_1-2. <https://doi.org/10.1051/hydro:1989101>
- Jenner HA, Taylor CJL, van Donk M, Khalanski M (1996) Chlorination By-Products in Chlorinated Cooling Water of some European Coastal Power Stations. 15
- Jenner HA, Taylor CJL, van Donk M, Khalanski M (1997) Chlorination by-products in chlorinated cooling water of some European coastal power stations. *Marine Environmental Research* 43:279–293. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(96\)00091-8](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(96)00091-8)
- Jha A (1998) Use of aquatic invertebrates in genotoxicological studies. *Mutation research* 399:1–2. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00261-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00261-3)
- Jimeno-Romero A, Bilbao E, Valsami-Jones E, et al (2019) Bioaccumulation, tissue and cell distribution, biomarkers and toxicopathic effects of CdS quantum dots in mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 167:288–300. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.035>
- Johnson MW, Heck KL, Fourqurean JW (2006) Nutrient content of seagrasses and epiphytes in the northern Gulf of Mexico: Evidence of phosphorus and nitrogen limitation. *Aquatic Botany* 85:103–111. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2006.02.003>
- Kargalioglu Y, McMillan BJ, Minear RA, Plewa MJ (2002) Analysis of the cytotoxicity and mutagenicity of drinking water disinfection by-products in *Salmonella typhimurium*. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 22:113–128. <https://doi.org/10.1002/tcm.10010>

- Kawecki TJ, Ebert D (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* 7:1225–1241. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x>
- Khalanski M, Jenner HA (2012) Chlorination Chemistry and Ecotoxicology of the Marine Cooling Water Systems. Operational and Environmental Consequences of Large Industrial Cooling Water Systems 183–226. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1698-2_9
- Khatri N, Tyagi S (2015) Influences of natural and anthropogenic factors on surface and groundwater quality in rural and urban areas. *Frontiers in Life Science* 8:23–39. <https://doi.org/10.1080/21553769.2014.933716>
- Kilemade MF, Hartl MGJ, Sheehan D, et al (2004) Genotoxicity of field-collected intertidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) as measured by the Comet assay. *Environ Mol Mutagen* 44:56–64. <https://doi.org/10.1002/em.20028>
- Kim D, Amy GL, Karanfil T (2015) Disinfection by-product formation during seawater desalination: A review. *Water Research* 81:343–355. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.040>
- Kirchman DL, Keil RG, Wheeler PA (1989) The effect of amino acids on ammonium utilization and regeneration by heterotrophic bacteria in the subarctic Pacific. *Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers* 36:1763–1776. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(89\)90071-X](https://doi.org/10.1016/0198-0149(89)90071-X)
- Kobayashi N, Nogami H, DOI K (1972) MARINE POLLUTION BIOASSAY BY USING SEA URCHIN EGGS IN THE INLAND SEA OF JAPAN (THE SETO-NAIKAI)I). 24
- Koch C, Sures B (2018) Environmental concentrations and toxicology of 2,4,6-tribromophenol (TBP). *Environmental Pollution* 233:706–713. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.127>
- Korkina L, Deeva I, Biase A, et al (2000) Redox-dependent toxicity of diepoxybutane and mitomycin C in sea urchin embryogenesis. *Carcinogenesis* 21:213–20
- Kottuparambil S, Agusti S (2018) PAHs sensitivity of picophytoplankton populations in the Red Sea. *Environmental Pollution* 239:607–616. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.079>
- Krasner SW, Weinberg HS, Richardson SD, et al (2006) Occurrence of a new generation of disinfection byproducts. *Environ Sci Technol* 40:7175–7185. <https://doi.org/10.1021/es060353j>
- Krasner SW, Westerhoff P, Chen B, et al (2009) Occurrence of Disinfection Byproducts in United States Wastewater Treatment Plant Effluents. *Environ Sci Technol* 43:8320–8325. <https://doi.org/10.1021/es901611m>
- Kreja L, Schochat T, Finking G (2003) Development of an in vitro model to study oxidative DNA damage in human coronary artery endothelial cells. *ALTEX* 20:71–76

- Kristensen T, Ketola T, Kronholm I (2018) Adaptation to environmental stress at different timescales: Adaptation to environmental stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1111/nyas.13974>
- Kundu B, Richardson S, Swartz P, et al (2004) Mutagenicity in Salmonella of halonitromethanes: A recently recognized class of disinfection by-products in drinking water. *Mutation research* 562:39–65. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.05.007>
- Kurihara H (2008) Effects of CO₂-driven ocean acidification on the early developmental stages of invertebrates. *Marine Ecology Progress Series* 373:275–284. <https://doi.org/10.3354/meps07802>
- Lagaria A, Mandalakis M, Mara P, et al (2017) Phytoplankton Response to Saharan Dust Depositions in the Eastern Mediterranean Sea: A Mesocosm Study. *Front Mar Sci* 3:. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00287>
- Lagiere J, El Najjar N, Dubourg K, et al (2017) La chimie du brome appliquée à la désinfection des eaux de piscines : étude bibliographique. *rsseau* 30:227–245. <https://doi.org/10.7202/1044249ar>
- Lampi P, Tolonen K, Vartiainen T, Tuomisto J (1992) Chlorophenols in lake bottom sediments: A retrospective study of drinking water contamination. *Chemosphere* 24:1805–1824. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(92\)90235-J](https://doi.org/10.1016/0045-6535(92)90235-J)
- Laporte M, Pavey SA, Rougeux C, et al (2016) RAD sequencing reveals within-generation polygenic selection in response to anthropogenic organic and metal contamination in North Atlantic Eels. *Mol Ecol* 25:219–237. <https://doi.org/10.1111/mec.13466>
- Latteman S (2010) Development of an Environmental Impact Assessment and Decision Support System for Seawater Desalination Plants. CRC Press
- Lazo-de-la-Vega-Monroy M-L, Fernandez-Mej C (2013) Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions. In: Morales-Gonzalez JA (ed) *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. InTech
- Leal MCF, Vasconcelos MT, Sousa-pinto I, Cabral JPS (1997) Biomonitoring with benthic macroalgae and direct assay of heavy metals in seawater of the Oporto coast (northwest Portugal). *Marine Pollution Bulletin* 34:1006–1015. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(97\)00112-4](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(97)00112-4)
- Lebaron K, Mechiri L, Richard S, et al (2019) Assessment of individual and mixed toxicity of bromoform, tribromoacetic-acid and 2,4,6 tribromophenol, on the embryolarval development of *Paracentrotus lividus* sea urchin. *Environ Sci Pollut Res* 26:20573–20580. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05279-8>
- Lee HJ, Kim GB, Lee RF (2012) Genotoxicity and development effects of brominated flame retardant PBDEs and UV-exposed PBDEs on grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryo. *Marine Pollution Bulletin* 64:2892–2895. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.08.010>

- Liang Q, Stolarski RS, Kawa SR, et al (2010) Finding the missing stratospheric Bry: a global modeling study of CHBr₃ and CH₂Br₂. *Atmos Chem Phys* 18
- Liang Y, Zhang Y, Wang N, et al (2017) Estimating Primary Production of Picophytoplankton Using the Carbon-Based Ocean Productivity Model: A Preliminary Study. *Front Microbiol* 8:
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01926>
- Liew D, Linge KL, Joll CA, et al (2012) Determination of halonitromethanes and haloacetamides: An evaluation of sample preservation and analyte stability in drinking water. *Journal of Chromatography A* 1241:117–122.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.037>
- Liman R, Ciğerci İH, Akyıl D, et al (2011) Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by Allium and Comet tests. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99:61–64.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.10.006>
- Linde AR, Sánchez-Galán S, Vallés-Mota P, García-Vázquez E (2001) Metallothionein as Bioindicator of Freshwater Metal Pollution: European Eel and Brown Trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49:60–63.
<https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2042>
- Liu J, Zhang X (2014) Comparative toxicity of new halophenolic DBPs in chlorinated saline wastewater effluents against a marine alga: Halophenolic DBPs are generally more toxic than haloaliphatic ones. *Water Research* 65:64–72.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.024>
- Liu M, Hansen PE, Lin X (2011) Bromophenols in Marine Algae and Their Bioactivities. *Mar Drugs* 9:1273–1292. <https://doi.org/10.3390/md9071273>
- Liyan Z, Ying H, Guangxing L (2005) Using DNA damage to monitor water environment. *Chin J Ocean Limnol* 23:340–348. <https://doi.org/10.1007/BF02847158>
- Llana-Belloch S, Priego Quesada JI, Pérez-Soriano P, et al (2016) Disinfection by-products effect on swimmers oxidative stress and respiratory damage. *European Journal of Sport Science* 16:609–617.
<https://doi.org/10.1080/17461391.2015.1080306>
- Lopez M, Choin J, Sikora M, et al (2019) Genomic Evidence for Local Adaptation of Hunter-Gatherers to the African Rainforest. *Current Biology* 29:2926–2935.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.07.013>
- Lüchmann KH, Clark MS, Bairy ACD, et al (2015) Key metabolic pathways involved in xenobiotic biotransformation and stress responses revealed by transcriptomics of the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana*. *Aquatic Toxicology* 166:10–20.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.06.012>
- Ludwig W, Bouwman A, Dumont E, Lespinas F (2010) Water and nutrient fluxes from major Mediterranean and Black Sea rivers: Past and future trends and their implications for the basin-scale budgets. *Global Biogeochemical Cycles - GLOBAL BIOGEOCHEM CYCLE* 24:.
<https://doi.org/10.1029/2009GB003594>

- Ludwig W, Dumont E, Meybeck M, Heussner S (2009) River discharges of water and nutrients to the Mediterranean and Black Sea: Major drivers for ecosystem changes during past and future decades? *Progress in Oceanography* 80:199–217. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2009.02.001>
- Manasfi T (2016) Contribution of organic UV filters to the formation of disinfection byproducts in chlorinated seawater swimming pools : occurrence, formation and genotoxicity. Thesis, Aix-Marseille
- Manasfi T, Lebaron K, Verlande M, et al (2018) Occurrence and speciation of chlorination byproducts in marine waters and sediments of a semi-enclosed bay exposed to industrial chlorinated effluents. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 222:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.06.008>
- Mandelker L (2008) Introduction to Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 38:1–30. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2007.10.005>
- Manel S, Perrier C, Pratlong M, et al (2016) Genomic resources and their influence on the detection of the signal of positive selection in genome scans. *Mol Ecol* 25:170–184. <https://doi.org/10.1111/mec.13468>
- Margoshes M, Vallee BL (1957) A CADMIUM PROTEIN FROM EQUINE KIDNEY CORTEX. *J Am Chem Soc* 79:4813–4814. <https://doi.org/10.1021/ja01574a064>
- Mathes R, Pfetsch B (1991) The Role of the Alternative Press in the Agenda-Building Process: Spill-over Effects and Media Opinion Leadership. *European Journal of Communication* 6:33–62. <https://doi.org/10.1177/0267323191006001003>
- McConnell O, Fenical W (1977) Halogen chemistry of the red alga *Asparagopsis*. *Phytochemistry* 16:367–374. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(77\)80067-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(77)80067-8)
- McGibbon S, Moldan AGS (1986) Routine toxicity testing of toxicants using a sea urchin gamete bioassay. *Marine Pollution Bulletin* 17:68–72. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(86\)90294-8](https://doi.org/10.1016/0025-326X(86)90294-8)
- McMichael MA (2007) Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc* 231:714–720. <https://doi.org/10.2460/javma.231.5.714>
- Migdal C, Serres M (2011) Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med Sci (Paris)* 27:405–412. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274017>
- Migliaccio O, Castellano I, Cirino P, et al (2015) Maternal Exposure to Cadmium and Manganese Impairs Reproduction and Progeny Fitness in the Sea Urchin *Paracentrotus lividus*. *PLOS ONE* 10:e0131815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131815>
- Migliaccio O, Castellano I, Romano G, Palumbo A (2014) Stress response to cadmium and manganese in *Paracentrotus lividus* developing embryos is mediated by nitric oxide. *Aquatic Toxicology* 156:125–134. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.08.007>

- Mille G, Asia L, Guiliano M, et al (2007) Hydrocarbons in coastal sediments from the Mediterranean sea (Gulf of Fos area, France). *Mar Pollut Bull* 54:566–575. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.12.009>
- Miller S, Wooster D, Li J (2007) Resistance and resilience of macroinvertebrates to irrigation water withdrawals. *Freshwater Biology* 52:2494–2510. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01850.x>
- Monarca S, Feretti D, Collivignarelli C, et al (2000) The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. *Water Research - WATER RES* 34:4261–4269. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00192-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00192-5)
- Moore RM, Webb MJ, Tokarczyk R, Wever R (1996) Bromoperoxidase and iodoperoxidase enzymes and production of halogenated methanes in marine diatom cultures. <https://doi.org/10.1029/96jc01248>
- Morgan TH (1894) Experimental studies on echinoderm eggs
- Morrone L, Pinsino A, Pellegrini D, et al (2016) Development of a new integrative toxicity index based on an improvement of the sea urchin embryo toxicity test. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 123:2–7. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.026>
- Mouly D, Joulin E, Rosin C, et al (2009) Les sous-produits de chloration dans l'eau destinée à la consommation humaine en France. 76
- Munch DJ, Munch JW, Pawlecki AM (1995) EPA Method 552.2 - Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid extraction, derivatization and gas chromatography with electron capture detection, Revision 1
- Muse JO, Stripeikis JD, Fernández FM, et al (1999) Seaweeds in the assessment of heavy metal pollution in the Gulf San Jorge, Argentina. *Environmental Pollution* 104:315–322. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(98\)00096-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(98)00096-7)
- Nagarajan A, Nathan S, Sridharan M (2018) Heavy metal assessment in surface sediments off Coromandel Coast of India: Implication on marine pollution. *Marine Pollution Bulletin* 131:712–726. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.074>
- Nahon S, Charles F, Pruski AM (2008) Improved Comet assay for the assessment of UV genotoxicity in Mediterranean sea urchin eggs. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49:351–359. <https://doi.org/10.1002/em.20391>
- Neidleman SL, Geigert J (1986) Biohalogenation — Principles, Basic Roles and Application. Ellis Horwood Series in Organic Chemistry
- Newsome L, Pacey N, Beadle I, Heaton A (2011) Chemical discharges from nuclear power stations: historical releases and implications for Best Available Technology

- Ng TY-T, Rainbow PS, Amiard-Triquet C, et al (2008) Decoupling of cadmium biokinetics and metallothionein turnover in a marine polychaete after metal exposure. *Aquatic Toxicology* 89:47–54. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.06.001>
- Nomiyama K, Eguchi A, Mizukawa H, et al (2011) Anthropogenic and naturally occurring polybrominated phenolic compounds in the blood of cetaceans stranded along Japanese coastal waters. *Environmental Pollution* 159:3364–3373. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.08.035>
- Norwegian Environment Agency (2012) SUBSTANCE EVALUATION CONCLUSION as required by REACH Article 48 and EVALUATION REPORT for 2,4,6-tribromophenol
- Ochi M, Kataoka K, Arika S, et al (1998) Antioxidative bromoindole derivatives from the mid-intestinal gland of the muricid gastropod *Drupella fragum*. *J Nat Prod* 61:1043–1045. <https://doi.org/10.1021/np980097r>
- Ofiara D, Seneca J (2006) Biological effects and subsequent economic effects and losses from marine pollution and degradations in marine environments: Implications from the literature. *Marine pollution bulletin* 52:844–64. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.02.022>
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Olive PL, Wlodek D, Banath JP (1991) DNA Double-Strand Breaks Measured in Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. *Cancer Research* 7
- OMI (2018) Ballast Water Management. International maritime organization:
- OMI (2019) BWM Convention and Guidelines. International maritime organization
- OMS (2005) 2,4,6 tribromophenol and other simple brominated phenols
- Ostapczuk P, Burow M, May K, et al (1997) Mussels and algae as bioindicators for long-term tendencies of element pollution in marine ecosystems. *Chemosphere* 34:2049–2058. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00067-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00067-2)
- Ovenden null, Capon null (1999) Echin sulfonic acids A-C and echinosulfone A: novel bromoindole sulfonic acids and a sulfone from a southern Australian marine sponge, *Echinodictyum*. *J Nat Prod* 62:1246–1249. <https://doi.org/10.1021/np9901027>
- Padhi R, Subramanian S, Mohanty A, et al (2012) Trihalomethanes in the Cooling Discharge of a Power Plant on Chlorination of Intake Seawater. *Environmental Engineering Research* 17:57–62. <https://doi.org/10.4491/eer.2012.17.S1.S57>
- Pagano G, de Biase A, Deeva IB, et al (2001) The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen. *Life Sci* 68:1735–1749. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(01\)00969-9](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(01)00969-9)

- Pagano G, Guida M, Trifuoggi M, et al (2017) Sea Urchin Bioassays in Toxicity Testing: I. Inorganics, Organics, Complex Mixtures and Natural Products. *Expert Opinion on Environmental Biology* 06: <https://doi.org/10.4172/2325-9655.1000142>
- Palmer CJ, Reason CJ (2009) Relationships of surface bromoform concentrations with mixed layer depth and salinity in the tropical oceans. *Global Biogeochemical Cycles* 23: <https://doi.org/10.1029/2008GB003338>
- Paul C, Pohnert G (2011) Production and role of volatile halogenated compounds from marine algae. *Nat Prod Rep* 28:186–195. <https://doi.org/10.1039/C0NP00043D>
- Pearse JS (2006) Ecological Role of Purple Sea Urchins. *Science* 314:940–941. <https://doi.org/10.1126/science.1131888>
- Pedersen M, Collen J, Abrahamsson K, Ekdahl A (1996) Production of halocarbons from seaweeds: An oxidative stress reaction? *SCIENTIA MARINA* 60:257–263
- Pedler BE, Aluwihare LI, Azam F (2014) Single bacterial strain capable of significant contribution to carbon cycling in the surface ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:7202–7207. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401887111>
- Pereira S, Bourrachot S, Cavalie I, et al (2011) Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30:2831–2837. <https://doi.org/10.1002/etc.695>
- Perrichon P (2014) Développement de tests embryonnaires prédictifs d'effets toxiques précoces et tardifs pour des molécules hydrophobes
- Pespeni MH, Garfield DA, Manier MK, Palumbi SR (2012) Genome-wide polymorphisms show unexpected targets of natural selection. *Proc Biol Sci* 279:1412–1420. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1823>
- Picard DJ, Schulte PM (2004) Variation in gene expression in response to stress in two populations of *Fundulus heteroclitus*. *Comp Biochem Physiol, Part A Mol Integr Physiol* 137:205–216
- Pinsino A, Torre CD, Sammarini V, et al (2008) Sea urchin coelomocytes as a novel cellular biosensor of environmental stress: a field study in the Tremiti Island Marine Protected Area, Southern Adriatic Sea, Italy. *Cell Biol Toxicol* 24:541–552. <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9055-0>
- Pizarro C, Sáenz-González C, Perez-del-Notario N, González-Sáiz JM (2010) Optimisation of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the simultaneous determination of halophenols and haloanisoles in wines. *Journal of Chromatography A* 1217:7630–7637. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.032>
- Plewa MJ, Kargalioglu Y, Vanker D, et al (2000) Development of quantitative comparative cytotoxicity and genotoxicity assays for environmental hazardous

- chemicals. *Water Sci Technol* 42:109–116.
<https://doi.org/10.2166/wst.2000.0558>
- Plewa MJ, Kargalioglu Y, Vanker D, et al (2002) Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity analysis of drinking water disinfection by-products. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 40:134–142. <https://doi.org/10.1002/em.10092>
- Plewa MJ, Muellner MG, Richardson SD, et al (2008) Occurrence, Synthesis, and Mammalian Cell Cytotoxicity and Genotoxicity of Haloacetamides: An Emerging Class of Nitrogenous Drinking Water Disinfection Byproducts. *Environmental Science & Technology* 42:955–961. <https://doi.org/10.1021/es071754h>
- Plewa MJ, Simmons JE, Richardson SD, Wagner ED (2010) Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity of the haloacetic acids, a major class of drinking water disinfection by-products. *Environ Mol Mutagen* 51:871–878.
<https://doi.org/10.1002/em.20585>
- Plewa MJ, Wagner ED, Jazwierska P, et al (2004) Halonitromethane Drinking Water Disinfection Byproducts: Chemical Characterization and Mammalian Cell Cytotoxicity and Genotoxicity. *Environmental Science & Technology* 38:62–68.
<https://doi.org/10.1021/es030477l>
- Powers SK, Jackson MJ (2008) Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Rev* 88:1243–1276.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2007>
- Pratlong M, Haguenaer A, Brener K, et al (2018) Separate the wheat from the chaff: genomic scan for local adaptation in the red coral *Corallium rubrum*. *bioRxiv* 306456. <https://doi.org/10.1101/306456>
- Prior RL, Cao G (1999) In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 27:1173–1181.
[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(99\)00203-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(99)00203-8)
- Pujo-Pay M, Conan P, Joux F, et al (2006) Impact of phytoplankton and bacterial production on nutrient and DOM uptake in the Rhône River plume (NW Mediterranean). *Marine Ecology Progress Series* 315:43–54.
<https://doi.org/10.3354/meps315043>
- Quack B, Atlas E, Petrick G, et al (2004) Oceanic bromoform sources for the tropical atmosphere. *Geophysical Research Letters* 31:.
<https://doi.org/10.1029/2004GL020597>
- Quack B, Wallace DWR (2003) Air-sea flux of bromoform: Controls, rates, and implications. *Global Biogeochemical Cycles* 17:.
<https://doi.org/10.1029/2002GB001890>
- Rainbow PS (1995) Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 31:183–192.
[https://doi.org/10.1016/0025-326X\(95\)00116-5](https://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00116-5)

- Rajagopal S, Jenner HA, Venugopalan VP (eds) (2012) Operational and Environmental Consequences of Large Industrial Cooling Water Systems. Springer US
- Raven JA, Geider RJ (1988) Temperature and algal growth. *New Phytologist* 110:441–461. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb00282.x>
- Reichelt JL, Borowitzka MA (1984) Antimicrobial activity from marine algae: Results of a large-scale screening programme. *Eleventh International Seaweed Symposium* 158–168
- Reineke N, Biselli S, Franke S, et al (2006) Brominated Indoles and Phenols in Marine Sediment and Water Extracts from the North and Baltic Seas—Concentrations and Effects. *Arch Environ Contam Toxicol* 51:186–196. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0135-3>
- Richardson S, Plewa M, Wagner E, et al (2007) Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 636:178–242. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.09.001>
- Richardson SD, DeMarini DM, Kogevinas M, et al (2010) What's in the Pool? A Comprehensive Identification of Disinfection By-products and Assessment of Mutagenicity of Chlorinated and Brominated Swimming Pool Water. *Environmental Health Perspectives* 118:1523–1530. <https://doi.org/10.1289/ehp.1001965>
- Richir J (2012) PhD J. Richir - Coastal pollution of the Mediterranean and extension of its biomonitoring to trace elements of emerging concern
- Rios C, Santander I, Méndez-Armenta M, et al (2018) Metallothionein-I. In: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/3265918/>. Accessed 27 Sep 2019
- Ríos JC, Repetto G, Jos A, et al (2003) Tribromophenol induces the differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells in vitro. *Toxicology in Vitro* 17:635–641. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(03\)00110-3](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00110-3)
- Rocha AC, Camacho C, Eljarrat E, et al (2018) Bioaccumulation of persistent and emerging pollutants in wild sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environmental Research* 161:354–363. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.11.029>
- Romano G, Costantini M, Buttino I, et al (2011) Nitric Oxide Mediates the Stress Response Induced by Diatom Aldehydes in the Sea Urchin *Paracentrotus lividus*. *PLoS ONE* 6:e25980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025980>
- Rook JJ, Rook JJ, Rook J, et al (1974) Formation of haloforms during chlorination of natural waters
- Ross PM, Parker L, Byrne M (2016) Transgenerational responses of molluscs and echinoderms to changing ocean conditions. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 73:537–549. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsv254>

- Ruttkay-Nedecky B, Nejdil L, Gumulec J, et al (2013) The role of metallothionein in oxidative stress. *Int J Mol Sci* 14:6044–6066. <https://doi.org/10.3390/ijms14036044>
- Sapone A, Gustavino B, Monfrinotti M, et al (2007) Perturbation of cytochrome P450, generation of oxidative stress and induction of DNA damage in *Cyprinus carpio* exposed in situ to potable surface water. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 626:143–154. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.09.010>
- Sarmiento JL, Slater R, Barber R, et al (2004) Response of ocean ecosystems to climate warming. *Global Biogeochemical Cycles* 18:. <https://doi.org/10.1029/2003GB002134>
- Savriama Y, Stige LC, Gerber S, et al (2015) Impact of sewage pollution on two species of sea urchins in the Mediterranean Sea (Cortiou, France): Radial asymmetry as a bioindicator of stress. *Ecological Indicators* 54:39–47. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.02.004>
- Scott JG (1996) Inhibitors of CYP6D1 in house fly microsomes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26:645–649. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(96\)00008-2](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(96)00008-2)
- Siddig AAH, Ellison AM, Ochs A, et al (2016) How do ecologists select and use indicator species to monitor ecological change? Insights from 14 years of publication in *Ecological Indicators*. *Ecological Indicators* 60:223–230. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.06.036>
- Sieracki ME, Poulton NJ, Jaillon O, et al (2019) Single cell genomics yields a wide diversity of small planktonic protists across major ocean ecosystems. *Sci Rep* 9:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42487-1>
- Silva GS da, Fé LML, Silva M de NP da, Val VMF de AE (2017) Ras oncogene and Hypoxia-inducible factor-1 alpha (hif-1 α) expression in the Amazon fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) exposed to benzo[a]pyrene. *Genet Mol Biol* 40:491–501. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0066>
- Sim W-J, Lee S-H, Lee I, et al (2009) Distribution and formation of chlorophenols and phenolic BFRs in marine and river environments. *Chemosphere* 77:552–558. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.006>
- Siron R, Giusti G (1990) Hydrocarbon pollution in particle-rich waters (Gulf of Fos-sur-mer): comparative study of extraction procedures. *Marine Chemistry* 30:379–388. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(90\)90082-N](https://doi.org/10.1016/0304-4203(90)90082-N)
- Smalling K, Deshpande A, Blazer V, et al (2016) Young of the year bluefish (*Pomatomus saltatrix*) as a bioindicator of estuarine health: Establishing a new baseline for persistent organic pollutants after Hurricane Sandy for selected estuaries in New Jersey and New York. *Marine Pollution Bulletin* 107:. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.019>

- Somero GN (2010) The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers.' *Journal of Experimental Biology* 213:912–920. <https://doi.org/10.1242/jeb.037473>
- Somero GN (2002) Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integr Comp Biol* 42:780–789. <https://doi.org/10.1093/icb/42.4.780>
- Stemmler I, Hense I, Quack B (2015) Marine sources of bromoform in the global open ocean – global patterns and emissions. *Biogeosciences* 12:1967–1981. <https://doi.org/10.5194/bg-12-1967-2015>
- Steurer C, Eder N, Kerschbaum S, et al (2018) HSF1 mediated stress response of heavy metals. *PLOS ONE* 13:e0209077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209077>
- Stevens JL, Snyder MJ, Koener JF, Feyereisen R (2000) Inducible P450s of the CYP9 family from larval *Manduca sexta* midgut. *Insect Biochem Mol Biol* 30:559–568
- Stump M, Dupont S, Thorndyke MC, Melzner F (2011) CO₂ induced seawater acidification impacts sea urchin larval development II: Gene expression patterns in pluteus larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 160:320–330. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.06.023>
- Taban IC, Bechmann RK, Torgrimsen S, et al (2004) Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. *Marine Environmental Research* 58:701–705. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.018>
- Takayama S, Dhabhi J, Roberts A, et al (2014) Genome methylation in *D. melanogaster* is found at specific short motifs and is independent of DNMT2 activity. *Genome Res* 24:821–830. <https://doi.org/10.1101/gr.162412.113>
- Taylor CJL (2006) The effects of biological fouling control at coastal and estuarine power stations. *Marine Pollution Bulletin* 53:30–48. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.01.004>
- Teixidó E, Piqué E, Gonzalez-Linares J, et al (2015) Developmental effects and genotoxicity of 10 water disinfection by-products in zebrafish. *J Water Health* 13:54–66. <https://doi.org/10.2166/wh.2014.006>
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al (2000a) Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. 16
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al (2000b) Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35:206–221. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J)
- Tomanek null, Somero null (1999) Evolutionary and acclimation-induced variation in the heat-shock responses of congeneric marine snails (genus *Tegula*) from different thermal habitats: implications for limits of thermotolerance and biogeography. *J Exp Biol* 202:2925–2936

- Tomasi A, Albano E, Biasi F, et al (1985) Activation of chloroform and related trihalomethanes to free radical intermediates in isolated hepatocytes and in the rat in vivo as detected by the ESR-spin trapping technique. *Chemico-Biological Interactions* 55:303–316. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(85\)80137-X](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(85)80137-X)
- Tominaga MY, Mídio AF (2003) Comparison of two validated gas-chromatographic methods for the determination of trihalomethanes in drinking water. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 39:195–202. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322003000200010>
- Ulses C, Grenz C, Marsaleix P, et al (2005) Circulation in a semi-enclosed bay under influence of strong freshwater input. *Journal of Marine Systems* 56:113–132. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2005.02.001>
- Urban-Malinga B, Wodzinowski T, Witalis B, et al (2018) Marine litter on the seafloor of the southern Baltic. *Marine Pollution Bulletin* 127:612–617. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.052>
- Urso ML, Clarkson PM (2003) Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189:41–54. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(03\)00151-3](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00151-3)
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 64:178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57–149
- Vasseur P, Cossu-Leguille C (2003) Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International* 28:711–717. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00116-2)
- Villanueva CM, Cantor KP, Cordier S, et al (2004) Disinfection Byproducts and Bladder Cancer: A Pooled Analysis. *Epidemiology* 15:357–367
- Villanueva CM, Cantor KP, Grimalt JO, et al (2006) Bladder Cancer and Exposure to Water Disinfection By-Products through Ingestion, Bathing, Showering, and Swimming in Pools. *American Journal of Epidemiology* 165:148–156. <https://doi.org/10.1093/aje/kwj364>
- Villemereuil PD (2016) Méthodes pour l'étude de l'adaptation locale et application au contexte de l'adaptation aux conditions d'altitude chez la plante alpine *Arabis alpina*. 203
- Viñas L, Pérez-Fernández B, Soriano JA, et al (2018) Limpet (*Patella* sp) as a biomonitor for organic pollutants. A proxy for mussel? *Marine Pollution Bulletin* 133:271–280. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.046>

- Von Gunten U, Bruchet A, Costentin E (1996) Bromate formation in advanced oxidation processes. *Journal - American Water Works Association* 88:53–65. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1996.tb06571.x>
- Wagner ED, Plewa MJ (2017) CHO cell cytotoxicity and genotoxicity analyses of disinfection by-products: An updated review. *Journal of Environmental Sciences* 58:64–76. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.04.021>
- Walther G-R, Post E, Convey P, et al (2002) Ecological Responses to Recent Climate Change. *Nature* 416:389–95. <https://doi.org/10.1038/416389a>
- Warwick NJ, Pyle JA, Carver GD, et al (2006) Global modeling of biogenic bromocarbons. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 111:. <https://doi.org/10.1029/2006JD007264>
- Whitehead A, Galvez F, Zhang S, et al (2011) Functional Genomics of Physiological Plasticity and Local Adaptation in Killifish. *Journal of Heredity* 102:499–511. <https://doi.org/10.1093/jhered/esq077>
- Whitfield FB, Helidoniotis F, Shaw KJ, Svoronos D (1999) Distribution of Bromophenols in Species of Marine Algae from Eastern Australia. *J Agric Food Chem* 47:2367–2373. <https://doi.org/10.1021/jf981080h>
- Whitfield FB, Helidoniotis F, Shaw KJ, Svoronos D (1998) Distribution of Bromophenols in Species of Ocean Fish from Eastern Australia. *J Agric Food Chem* 46:3750–3757. <https://doi.org/10.1021/jf980274u>
- WHO (1996) Chlorophenols in drinking water. *Guidelines for Drinking-water Quality*
- Wong JM, Gaitán-Espitia JD, Hofmann GE (2019) Transcriptional profiles of early stage red sea urchins (*Mesocentrotus franciscanus*) reveal differential regulation of gene expression across development. *Marine Genomics* S1874778719301059. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2019.05.007>
- Wu X, Jia Y, Zhu H (2012) Bioaccumulation of cadmium bound to ferric hydroxide and particulate organic matter by the bivalve *M. meretrix*. *Environmental Pollution* 165:133–139. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.02.023>
- Würgler FE, Kramers PG (1992) Environmental effects of genotoxins (ecogenotoxicology). *Mutagenesis* 7:321–327. <https://doi.org/10.1093/mutage/7.5.321>
- Xiang J, Wan C, Guo R, Guo D (2016) Is Hydrogen Peroxide a Suitable Apoptosis Inducer for All Cell Types? *BioMed Research International* 2016:1–6. <https://doi.org/10.1155/2016/7343965>
- Xu X, Song F, Fan X, et al (2009) A novel bromophenol from marine red alga *Symphyclocladia latiuscula*. *Chemistry of Natural Compounds - CHEM NAT COMPD* 45:811–813. <https://doi.org/10.1007/s10600-010-9501-0>

- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell* 6:251–264. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.2.251>
- Yamamuro M, Kayanne H, Yamano H (2003) $\delta^{15}\text{N}$ of seagrass leaves for monitoring anthropogenic nutrient increases in coral reef ecosystems. *Marine pollution bulletin* 46:452–8. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00463-0](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00463-0)
- Yang JS (2001) Bromoform in the effluents of a nuclear power plant: a potential tracer of coastal water masses. 7
- Yang M, Zhang X (2013) Comparative Developmental Toxicity of New Aromatic Halogenated DBPs in a Chlorinated Saline Sewage Effluent to the Marine Polychaete *Platynereis dumerilii*. *Environmental Science & Technology* 47:10868–10876. <https://doi.org/10.1021/es401841t>
- Yıldız M, Cığerci İH, Konuk M, et al (2009) Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere* 75:934–938. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.023>
- Yokouchi Y, Hasebe F, Fujiwara M, et al (2005) Correlations and emission ratios among bromoform, dibromochloromethane, and dibromomethane in the atmosphere. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* 110:. <https://doi.org/10.1029/2005jd006303>
- Yoshioka Y, Ose Y, Sato T (1985) Testing for the toxicity of chemicals with *Tetrahymena pyriformis*. *Science of The Total Environment* 43:149–157. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(85\)90037-3](https://doi.org/10.1016/0048-9697(85)90037-3)
- Yousef MK (1985) Stress physiology in livestock. Volume I. Basic principles. *Stress physiology in livestock Volume I Basic principles*
- Yuan J, Liu H, Zhou L-H, et al (2006) Oxidative stress and DNA damage induced by a drinking-water chlorination disinfection byproduct 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 609:129–136. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.05.011>
- Zinser E, Johnson Z, Coe A, et al (2007) Influence of Light and Temperature on *Prochlorococcus* Ecotype Distributions in the Atlantic Ocean. *Limnology and Oceanography* 52:2205–2220. <https://doi.org/10.2307/4502370>
- Zukal J, Pikula J, Bandouchova H (2015) Bats as bioindicators of heavy metal pollution: History and prospect. *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde* 80:. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2015.01.001>

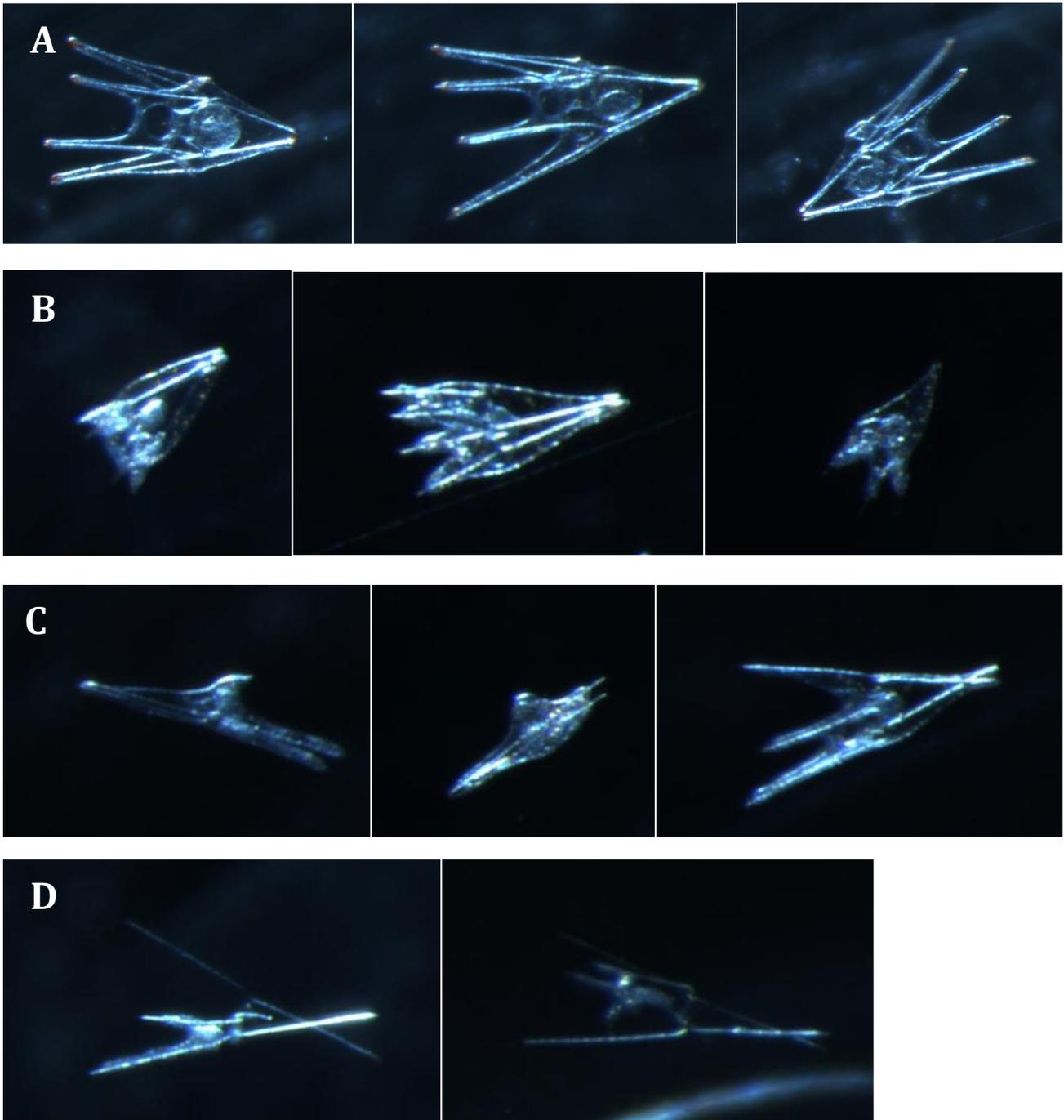
ANNEXES

*Annexe 1 : Photos de larves d'oursin *Paracentrotus lividus** _____ *I*

Annexe 2 : Publication, campagne 1 _____ *II*

Annexe 3 : Publication, écotoxicologie _____ *III*

Annexe 1 : Photos de larves d'oursin *Paracentrotus lividus*



Photos de larves *Pluteus*

A : Larves de référence ; B : Larves ayant un retard de croissance ; C : Larves malformées ; D : Squelettes de larves mortes.

Annexe 2 : Publication, campagne 1

International Journal of Hygiene and Environmental Health 222 (2019) 1–8



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Hygiene and
Environmental Health

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



Occurrence and speciation of chlorination byproducts in marine waters and sediments of a semi-enclosed bay exposed to industrial chlorinated effluents



Tarek Manasfi^{a,*}, Karine Lebaron^a, Maxime Verlande^a, Julien Dron^b, Carine Demelas^a,
Laurent Vassalo^a, Gautier Revenko^b, Etienne Quivet^a, Jean-Luc Boudenne^a

^a Aix Marseille Univ, CNRS, LCE UMR7376, 13331, Marseille, France

^b Institut Ecocitoyen Pour la Connaissance des Pollutions, Centre de vie la Fossette RD 268, 13270, Fos-sur-Mer, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Chlorination byproducts
Disinfection byproducts
Industrial chlorinated effluents
Cooling water
Marine sediments
Seawater pollution

ABSTRACT

Chlorination of seawater is one of the most effective technologies for industrial biofouling control. However, chlorination leads to the formation of halogenated chlorination byproducts (CBPs) associated with potential risks to environmental and human health. The present study investigated the occurrence and distribution of CBPs in the Gulf of Fos, a semi-enclosed bay where chlorinated effluents of multiple industrial plants are discharged. Seawater samples (surface and bottom) were collected at 24 sampling stations, with some near industrial outlets and others dispersed throughout the bay. Sediment samples were also collected at 10 sampling stations. Physicochemical parameters including water temperature, pH, salinity, bromide content, and free and total residual oxidant were determined. Several chemical classes of CBPs including trihalomethanes, haloacetic acids, haloacetonitriles, trihaloacetaldehydes, and halophenols were analyzed. Bromoform was the most abundant CBP in seawater, and it was detected at most of the sampling stations of the bay with highest concentrations occurring near the industrial effluent outlets. Dibromoacetic acid was the second most abundant CBP at most of the sites followed by dibromoacetonitrile. Other detected CBPs included tribromoacetic acid, bromochloroacetonitrile, and bromal hydrate. To our knowledge, the concentration of the latter CBP was reported here for the first time in the context of industrial seawater chlorination. In sediments, two bromine-containing halophenols (2-chloro-4-bromophenol and 2,4,6-tribromophenol) were detected at two sampling stations. Ecotoxicological assays and risk assessment studies based on the detected environmental concentrations are warranted to elucidate the impacts of marine CBP contamination.

1. Introduction

The use of seawater in industrial cooling or heating is a common practice in many parts of the world. One of the primary operational problems of using seawater in such processes is biofouling, which results from the growth of microorganisms (biofilms) and macro-organisms (e.g., clams) on the surface or inside industrial equipment. Biofilms tend to stick to heat-exchange surfaces, thereby significantly reducing heat-transfer coefficients, while excessive development of macro-organisms can plug heat exchangers. There are several techniques for preventing both types of biofouling. Chlorination of seawater is among the most commonly used antibiofouling treatments (Khalanski and Jenner, 2012). Chlorine is added into seawater either in the gaseous form or in the aqueous form of sodium hypochlorite solution, typically

at doses of 0.5–1.5 mg/L (expressed as Cl₂) (Allonier et al., 1999a,b; Ma et al., 2011; Khalanski and Jenner, 2012). In seawater, chlorine reacts with organic and inorganic compounds leading to the formation of chlorination byproducts (CBPs) (or disinfection byproducts, DBPs) (Heeb et al., 2014). Several factors including initial chlorine dose, temperature, pH, constitution of seawater and presence of contaminants (natural or anthropogenic) can influence these reactions, leading to differences in the nature and levels of the formed CBPs (Allonier et al., 1999b; Heeb et al., 2014).

The release of chlorinated seawater into the environment constitutes a concern from environmental and human health standpoints. Chemical hazards associated with chlorination of seawater can be divided into acute effects from the action of strong oxidants and long-term effects caused by CBPs. While the employed oxidants generally act

* Corresponding author. Aix Marseille Université, 3 Place Victor Hugo, Case 29, 13331, Marseille, France.

E-mail addresses: tarek.manasfi@univ-amu.fr (T. Manasfi), karine.lebaron@univ-amu.fr (K. Lebaron), maxime.verlande@univ-amu.fr (M. Verlande), julien.dron@institut-ecocitoyen.fr (J. Dron), carine.demelas@univ-amu.fr (C. Demelas), laurent.vassalo@univ-amu.fr (L. Vassalo), gautier.revenko@institut-ecocitoyen.fr (G. Revenko), etienne.quivet@univ-amu.fr (E. Quivet), jean-luc.boudenne@univ-amu.fr (J.-L. Boudenne).

<https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.06.008>

Received 29 January 2018; Received in revised form 1 June 2018; Accepted 28 June 2018

1438-4639/ © 2018 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Annexe 3 : Publication, écotoxicologie

Environmental Science and Pollution Research (2019) 26:20573–20580
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-05279-8>

RESEARCH ARTICLE



Assessment of individual and mixed toxicity of bromoform, tribromoacetic-acid and 2,4,6 tribromophenol, on the embryo-larval development of *Paracentrotus lividus* sea urchin

Karine Lebaron^{1,2} · Lilia Mechiri¹ · Simone Richard¹ · Annabelle Austruy³ · Jean-Luc Boudenne² · Stéphane Coupé¹

Received: 28 January 2019 / Revised: 27 March 2019 / Accepted: 25 April 2019 / Published online: 18 May 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Water chlorination is the most widely used technique to avoid microbial contamination and biofouling. Adding chlorine to bromide-rich waters leads to the rapid oxidation of bromide ions and leads to the formation of brominated disinfection by-products (bromo-DBPs) that exert adverse effects on various biological models. Bromo-DBPs are regularly encountered within industrialized embayments, potentially impacting marine organisms. Of these, bromoform, tribromoacetic acid and tribromophenol are among the most prevalent. In the present study, we tested the potential toxicity and genotoxicity of these disinfection by-products, using sea urchin, *Paracentrotus lividus*, embryos. We highlighted that tribromophenol showed higher toxicity compared to bromoform and tribromoacetic acid. Furthermore, a synergistic effect was detected when tested in combination. Pluteus cells exposed for 1 h to mixtures of DBPs at several concentrations demonstrated significant DNA damage. Finally, when compared to a non-exposed population, sea urchins living in a bromo-DBP-polluted area produced more resistant progenies, as if they were locally adapted. This hypothesis remains to be tested in order to better understand the obvious impact of complex bromo-DBPs environments on marine wildlife.

Keywords Bromoform · Tribromoacetic acid · Tribromophenol · Disinfection by-products · Sea urchin · *Paracentrotus lividus* · Ecotoxicology · Genotoxicity

Highlights

- Tribromophenol is 10 to 30 times more toxic than bromoform and tribromoacetic acid
- Bromo-DBPs are genotoxic
- Effective concentrations are several orders of magnitude higher than environmental ones
- Progenies of locally exposed adults are resistant to bromoform
- Potential local adaptation to bromo-DBPs (bromoform)

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Karine Lebaron
karine.lebaron@univ-amu.fr

Lilia Mechiri
lilia.mechiri@gmail.com

Simone Richard
simone.richard@univ-tln.fr

Annabelle Austruy
annabelle.austruy@institut-ecocitoyen.fr

Jean-Luc Boudenne
jean-luc.boudenne@univ-amu.fr

Stéphane Coupé
stephane.coupe@univ-tln.fr

¹ CNRS/INSU, IRD, MIO UM 110, Mediterranean Institute of Oceanography, Université Toulon, La Garde, France

² CNRS, LCE UMR7476, Aix-Marseille-Université, 13331 Marseille, France

³ Centre de Vie La Fossette, Institut Ecocitoyen pour la Connaissance des Polluions, 13270 Fos-sur-Mer, France

RESUME

La chloration est l'une des techniques les plus utilisées pour la désinfection de l'eau et est également considérée comme l'un des traitements les plus efficaces disponibles pour le contrôle du biofouling. Cependant, le chlore est très réactif vis-à-vis des matières organiques naturelles, de l'ammonium et du bromure présents dans l'eau de mer. Les réactions du chlore avec ces espèces conduisent à la formation de plusieurs sous-produits bromés appelés des sous-produits de chloration (DBPs), dont la nature, les concentrations et les écotoxicités sont peu documentés dans la littérature. Ce travail vise à évaluer l'occurrence et les impacts des rejets chlorés dans une zone fortement industrialisée, située dans une baie semi-fermée du sud-est de la France. Dans cette zone, la quantité totale des rejets quotidiens est estimée à 6 millions de mètres cubes d'eau chlorée. Six campagnes d'échantillonnage en mer ont été menées entre 2017 et 2019. Un niveau total de sous-produits de chloration de l'ordre du microgramme par litre a été mesuré. Les familles de DBPs principalement retrouvées sont les trihalométhanes (THM), les acides haloacétiques (HAA), les haloacétonitriles (HAN) et les halophénols (HP). Parallèlement, la toxicité aiguë et la génotoxicité ont été mesurées sur des larves de l'oursin Méditerranéen *Paracentrotus lividus*. Les trois principales molécules bromées retrouvées dans les différentes matrices du golfe commencent à être toxiques à des concentrations de l'ordre du milligramme par litre. Cependant, une tolérance au bromoforme chez les larves issues d'oursins adultes prélevés dans le golfe de Fos, comparativement à des larves issues d'adultes vivant en zones non polluées a été démontrée. Cela indique que les populations du golfe de Fos sont probablement adaptées pour contrer les effets de l'exposition chronique à la multi-pollution.

Mots clés : Sous-produits de chloration • Occurrence • Oursin • Ecotoxicité • Adaptation • Golfe de Fos

ABSTRACT

Chlorination is one of the most widely used techniques for water disinfection and is also considered as one of the most effective treatments available for the control of biological fouling. However, chlorine reacts very well to natural organic matter, ammonium and bromide, all present in seawater. The reactions of chlorine with these species lead to the formation of several bromine by-products called disinfection by-products (DBPs), which nature, concentrations and ecotoxicity of which are poorly documented. This study aims to assess the levels and impacts of chlorinated discharges in a highly industrialized area located in a semi-enclosed bay in Southeastern France. In this zone, the total quantity of daily releases is estimated to reach 6 million cubic meters of chlorinated water. Six sampling campaigns at sea were conducted between 2017 and 2019. A total level of disinfection by-products of the order of micrograms per liter was measured. The main families of DBP found were trihalomethanes (THMs), haloacetic acids (HAA), haloacetonitriles (HAN) and halophenols (HP). At the same time, acute toxicity and genotoxicity were measured on sea urchin larvae *Paracentrotus lividus*. The three main brominated molecules, all present in the different matrices of the Fos, start to be toxic and genotoxic, at concentrations close to milligram per liter. However, the higher tolerance to bromoform, of larvae produced by adult sea urchins caught in the Gulf of Fos, compared to larvae of adults living in unpolluted areas, has been demonstrated. This indicates that populations living in Fos, are likely adapted to counteract the effects of a chronic exposure to multiple pollution.

Key words : Disinfection by-products • Occurrence • Urchin • Ecotoxicity • Adaptation • Fos embayment