

Rapport

Seine-Aval 4



COBAC

Etude des processus adaptatifs susceptibles
de se mettre en place au sein
de populations d'*Eurytemora affinis* exposées
à diverses contaminations chimiques
et/ou microbiologiques



Forget-Leray J., Petit F., Souissi S., Budzinski H.



Octobre 2012

Seine-Aval
GROUPEMENT D'INTÉRÊT PUBLIC

GIP Seine-Aval
Pôle Régional des Savoirs
115 Bd de l'Europe
76 100 - Rouen

tel : 02 35 08 37 64
<http://www.seine-aval.fr>

RAPPORT SCIENTIFIQUE MARS 2012

COBAC

Etude des processus adaptatifs susceptibles de se mettre en place au sein de populations d'*Eurytemora affinis* exposées à diverses contaminations chimiques et/ou microbiologiques

Liste des scientifiques ayant participé au projet :

- (1) Joëlle Forget-Leray, Céline Boulangé-Lecomte, Benoit Xuereb, Nathalie Petruccianni, Teddy Lesueur
LEMA EA 322, Université du Havre, FEDSCALE 4116
- (2) Fabienne Petit, Thierry Berthe, Kenny Oberlé, Gautier Cheix
M2C, UMR6143CNRS, Université de Rouen, FEDSCALE 4116
- (3) Sami Souissi, Anissa BenRadhia-Souissi
UMR CNRS LOG, Université de Lille 1
- (4) Hélène Budzinski, Karyn Le Menach
EPOC UMR 5805, groupe LPTC, Université Bordeaux 1,

Sommaire

1. Introduction présentant le contexte et les questionnements à l'initiative du projet
2. Zone géographique concernée
3. L'espèce concernée : *Eurytemora affinis*
4. Contaminants testés
 - 4.1 Benzo(a)pyrène (BaP)
 - 4.2 4-Nonylphénol (4-NP)
 - 4.3 Polychlorobiphényl 126 (PCB126)
5. Méthodes
 - 5.1 Prélèvement et acclimatation – Prélèvement et Dissociation
 - 5.1.1 Prélèvement et acclimatation
 - 5.1.2 Prélèvement et Dissociation
 - 5.2 Préparation des solutions d'exposition
 - 5.3 Analyse des contaminants dans les milieux d'exposition
 - 5.4 Bioessai mortalité sur le stade adulte (CL50, 48h)
 - 5.5 Bioessai nauplien (6 jours)
 - 5.6 Bioessai multi générationnel (2 mois)
 - 5.7 Mise au point d'un protocole de dissociation des bactéries viables associées aux copépodes
 - 5.8 Colonisation des copépodes par *Vibrio* en mésocosm
6. Résultats scientifiques détaillés acquis au cours du projet
 - 6.1 Analyses préliminaires de la teneur réelle en 4-NP au cours des expositions
 - 6.2 Capacité d'adaptation au stress Chimique
 - 6.2.1 Mortalité et Dérive des CL50
 - 6.2.2 Acclimatation au cours du développement nauplien
 - 6.2.3. Adaptation au cours de la succession des générations
 - 6.2.3.1 Acclimatation aux conditions contrôlées (croissance et fécondité)
 - 6.2.3.2 Suivi des paramètres individuels (traits de vie) sur 3 générations successives
 - 6.2.3.3 Suivi des paramètres populationnels
 - 6.3 Capacité d'adaptation » au stress biologique d' *Eurytemora affinis* et impact sur son microbiote
 - 6.3.1 Rôle des copépodes comme vecteur de bactéries pathogènes pour l'homme d'origine allochtones
 - 6.3.2 Réponse des copépodes *E.affinis* à une infection par *Vibrio* sp
 - 6.4 Conclusion
7. Retombées opérationnelles directes et/ou indirectes du projet
8. Conclusion présentant notamment les perspectives de poursuite et/ou les questionnements nouveaux
9. Perspectives

Liste des communications et/ou publications publiés et/ou soumises par l'ensemble des équipes du projet.

Bibliographie des publications citées dans le rapport.

1. Introduction présentant le contexte et les questionnements à l'initiative du projet

Les modifications anatomiques, physiologiques et/ou comportementales qui peuvent être observées au sein des populations d'organismes en réponse à des contraintes environnementales (biotiques et/ou abiotiques) sont le résultat de deux phénomènes : (i) l'acclimatation qui fait intervenir la plasticité phénotypique des individus et (ii) l'adaptation qui est le résultat de la sélection naturelle, impliquant des changements génotypiques. Ces processus d'acclimatation et d'adaptation ont pour but de maintenir la survie et le succès reproducteur (i.e., la valeur adaptative ou fitness) des individus.

Les populations naturelles sont exposées à de multiples pressions de sélection variant dans le temps et dans l'espace. Sous certaines conditions, incluant des gradients environnementaux suffisamment forts et l'absence d'importants flux de gène, une adaptation génétique des populations peut avoir lieu en réponse aux pressions de sélection locales. De telles adaptations confèrent aux populations résidentes une meilleure valeur adaptative vis-à-vis de l'habitat local, en comparaison aux populations provenant d'autres habitats (Kawecki et Ebert, 2004).

Dans cette logique on peut s'attendre à ce que les populations puissent également s'adapter localement à des stress de nature anthropique tels que l'exposition à divers pollutions chimiques et/ou aux agents pathogènes (bactéries, virus parasites). Quelques études rapportent l'acquisition de tolérance aux pesticides ainsi qu'aux métaux lourds chez certaines espèces animales et végétales (Kawecki et Ebert, 2004 ; Morgan et al., 2007). En milieu estuarien fortement anthropisé, il a aussi été montré que les copépodes étaient colonisés à leur surface par des bactéries d'origine fécale (Signoretto et al., 2004, 2005 ; Fries et al., 2006) mais aussi par des bactéries autochtones potentiellement pathogène pour l'homme (*Vibrio cholerae*) (Pruzzo et al., 2008). En estuaire de Seine, une étude prospective a montré que les copépodes sont associés à des bactéries d'origine fécale (*E. coli*) à raison de 10 UFC/copépode (programme Seine- Aval /projet FLASH 2009). On ne connaît pas aujourd'hui la relation entre l'exposition au stress et la colonisation d'*Eurytemora affinis* par ces bactéries, ni les conséquences éventuelles de cette colonisation sur leurs traits de vie. Dans la majorité des cas, la distinction entre une acclimatation physiologique et une sélection génétique n'est pas clairement établie. Comprendre les mécanismes adaptatifs de la faune sauvage vis-à-vis de pollutions de natures diverses est une étape essentielle dans la démarche d'une évaluation prédictive des risques écologiques liés aux activités humaines.

L'estuaire de Seine est un milieu soumis à une très forte pression anthropique caractérisée par d'importants niveaux de contamination chimique et microbiologique (Seine aval 2 et 3). En dépit de ces contraintes, un micro-crustacé zooplanctonique, le copépode *Eurytemora affinis*, s'y est largement développé et domine la communauté zooplanctonique. Depuis près d'une dizaine d'années maintenant, de nombreux efforts ont été fournis, dans le cadre du programme Seine Aval, pour décrire l'écophysiologie de cette espèce, soulignant l'intérêt

de cet organisme à être utilisé en tant que sentinelle de la qualité du milieu (Seine aval 3). Toutefois, l'interprétation des outils de bioévaluation développés au cours de ces travaux se confronte aujourd'hui au manque de connaissance concernant les capacités d'acclimatation et/ou d'adaptation des populations d'*E. affinis* vis-à-vis d'une exposition à des contaminants chimiques et microbiologiques. Ces capacités adaptatives peuvent aussi être une réponse à une contamination spécifique d'une zone géographique. Ainsi, des auteurs ont récemment pu montrer l'adaptation de populations naturelles de *Daphnia magna* à un insecticide carbamate (Coors et al., 2009). Les copépodes au cycle de vie court tels que *E. affinis* se prêtent parfaitement à l'étude des mécanismes adaptatifs puisqu'ils offrent la possibilité de travailler sur un grand nombre d'individus sur plusieurs générations notamment en conditions contrôlées.

En effet, le travail expérimental mené dans le cadre du projet ZOOSEINE (Seine aval 4) et plus particulièrement dans le cadre de la thèse de doctorat d'Anissa Ben Radhia-Souissi (2010) a permis de mettre au point un nouveau protocole expérimental multi-générationnel qui permet de suivre de nombreux paramètres biologiques d'une population d'*Eurytemora affinis* sur plusieurs générations. Ce protocole a été validé pour tester la réaction d'une population d'*Eurytemora affinis* provenant de l'estuaire de Seine à un scénario de réchauffement climatique (+4°C). Ces travaux ont confirmé l'importance de la durée de la phase d'acclimatation des copépodes dans des conditions contrôlées avant d'étudier les effets de paramètres environnementaux ciblés sur les traits de vie de ces organismes. Au cours de cette étude la population d'*E. affinis* de l'estuaire de la Seine a montré une grande capacité d'adaptation face à une augmentation de la température. C'est dans ce contexte et dans le cadre de l'« Action IX : Capacités d'adaptation des invertébrés aux expositions à des substances toxiques et/ou pathogènes en milieu naturel », que se situe le projet COBAC. Il s'inscrit dans une démarche exploratoire basée sur une double approche laboratoire / terrain visant à étudier les « processus adaptatifs » (i.e., plasticité phénotypique ou adaptations génétiques) susceptibles de se mettre en place au sein de populations d'*E. affinis* exposées à diverses contaminations chimiques et/ou pathogènes.

Dans le cadre du projet COBAC, nous avons voulu explorer la capacité de ce copépode à faire face à certaines classes de contaminants présents (HAP, AP, et PCB) dans l'estuaire de la Seine. L'objectif final est de tenter de comprendre les mécanismes mis en place par *E. affinis* aux échelles individuelle et populationnelle face à la contamination chimique et microbiologique.

2. Zone géographique concernée

Les prélèvements (eau et organismes) ont été réalisés à Tancarville, dans la zone oligohaline de l'estuaire de la Seine (point kilométrique 337) à proximité de la zone industrielle de Port-Jérôme (Figure 1 et 2).



Figure 1 : Site d'échantillonnage des copépodes *E.affinis* en amont du pont de Tancarville (Source GIP SA)



Figure 2 : Prélèvement d'un échantillon de la colonne d'eau à la bouteille Niskin

3. L'Espèce concernée : *Eurytemora affinis*

Du fait de son rôle important dans les systèmes estuariens européens et nord-américains, le microcrustacé *Eurytemora affinis* (Poppe), a fait l'objet de nombreuses études depuis le début du siècle. Cette espèce domine le mésozooplancton de nombreux estuaires, sur le continent nord américain (Allan et Daniels, 1982 ; Kimmel et Bradley, 2001), en Europe (Roddie et al., 1984; Forget-Leray et al., 2005, Cailleaud et al., 2007) et enfin en Asie (Ban,

1994). Par ailleurs, cette espèce présente de nombreux avantages pour des études en laboratoire. Elle possède un cycle de vie court (Katona, 1971), avec plusieurs stades de développement et un seul stade reproducteur. En estuaire de Seine, cette espèce est facile à récolter du fait de son abondance et peut être cultivée en laboratoire sur plusieurs générations (Devreker et al., 2004 et 2007a, Souissi et al., 2010). *E. affinis* est un producteur secondaire qui assure un lien trophique important entre le phytoplancton, le microzooplancton, et les plus hauts niveaux trophiques tels que les macroinvertébrés et les poissons (Mouny et Dauvin, 2002). Ces organismes peuvent par conséquent contribuer aux transferts de contaminants dissous dans l'eau ou adsorbés sur la matière organique vers les plus hauts niveaux trophiques (Abarnou et al., 2000). D'autre part ce sont des organismes particulièrement sensibles aux polluants et qui sont donc souvent utilisés en tant qu'espèce bioindicatrice pour évaluer la qualité des eaux (Ramade, 1992).

Le paradoxe chez cette espèce en estuaire de Seine réside dans le fait que malgré la forte anthropisation de l'estuaire de Seine, ce copépode semble s'être relativement bien adapté à ce milieu puisqu'il représente 90 à 100% du mésozooplancton (Mouny et Dauvin 2002). *Eurytemora affinis*.

Reproduction et cycle de vie

On distingue un dimorphisme sexuel entre les mâles (800-960 µm) et les femelles (920-1100 µm) (Mouny, 1998) caractérisé par une différence de taille et des critères morphologiques (Figure 2). Les mâles présentent notamment une antenne droite modifiée et un appendice au niveau de l'abdomen leur permettant d'accrocher la femelle. *E. affinis* présente une reproduction sexuée obligatoire (oviparité). Le mâle recherche la femelle via la détection de ses phéromones sexuelles produites dans le milieu (Katona, 1973). Le mâle agrippe alors la femelle au niveau d'une de ses antennes puis fixe un ou plusieurs spermatophores au niveau du « segment » génital de la femelle. Une femelle peut porter plusieurs spermatophores mais ne peut porter qu'un seul sac ovigère à la fois.

La durée du cycle de vie du copépode *E. affinis* dépend des conditions abiotiques, néanmoins dans des conditions optimales le cycle dure entre 18 et 21 jours. Pendant son développement, le copépode *E. affinis*, passe par trois phases successives comportant des

métamorphoses : la phase nauplienne (6 stades et 5 mues), la phase copépodite (5 stades et 4 mues) avant d’atteindre l’âge adulte caractérisé par un dimorphisme sexuel (figure 2). Une fois le stade adulte atteint, les copépodes sont capables de se reproduire. Lors de la reproduction, le mâle capture et immobilise la femelle puis fixe un ou plusieurs spermatophores. Une femelle peut porter plusieurs spermatophores et par conséquent être fécondée par plusieurs mâles. Une fois fécondées, les femelles portent un sac ovigère contenant des œufs. Elles sont ainsi facilement différenciables des autres individus.

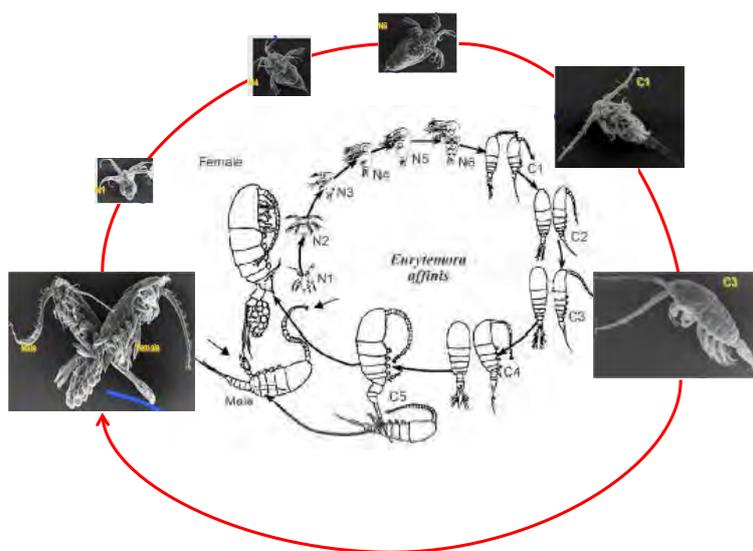


Figure 3: cycle de vie du copépode *E. affinis* (d’après Katona, 1970, modifié par Souissi, 2001)

4. Contaminants testés

Les contaminants sélectionnés sont des molécules préoccupantes en estuaire de Seine. Ils appartiennent tous à la liste-cadre des 33 substances ou familles de composés arrêtée au niveau européen (Directive 2008/105/CE). Pour les expositions, les concentrations ont été choisies en fonction des concentrations de ces composés dans la colonne d’eau en estuaire de Seine (déterminées lors de précédentes études dans le cadre de Seine aval III).

La dose 1X équivaut à 200 ng/L pour le PCB 126, 500 ng/L pour el B(a)P et à 1000 ng/L pour le 4-NP ; X représente la concentration environnementale de ces composés.

4.1 Benzo(a)pyrène (BaP)

Bien que complexe, la contamination de l’estuaire de Seine est marquée par la

prédominance des HAP. L'intensité de cette contamination est toutefois variable, que ce soit d'un point de vue temporel, avec des rythmes dépendant des cycles météorologiques et tidaux, que d'un point de vue spatial mais aussi suivant le compartiment considéré (Dégremont et Cachot, 2009).

Le compartiment abiotique le plus contaminé par les HAP est constitué par les sédiments. Les sédiments forment alors une source de contamination secondaire importante à plus ou moins long terme. Les HAP, bien que peu hydrosolubles se retrouvent dans les eaux de l'estuaire de Seine. Des mesures effectuées en 1993 ont montré une contamination de l'eau entre 158 ng/l à Poses jusqu'à 687 ng/l à la limite de salure. (Fernandes *et al.*, 1997). Au niveau du bouchon vaseux, des teneurs en HAP de l'ordre de 227 ng/l ont pu être mesurées dans la colonne d'eau, mais seulement 5% se trouvent dans la phase dissoute (Cailleaud *et al.*, 2007a).

Des dosages de HAP effectués sur des moules zébrées (*Dreissena polymorpha*) ont montré une contamination par des HAP, à des niveaux compris entre 340 ng/g et 990 ng/g de poids sec, avec près de deux tiers de HAP mutagènes (Rocher *et al.*, 2006). Le compartiment biotique est également contaminé par les HAP. Chez le copépode *Eurytemora affinis*, les concentrations peuvent aller jusqu'à 4 µg/g (Cailleaud *et al.*, 2007a).

4.2 4-Nonylphénol (4-NP)

Les alkylphénols ne sont pas des composés naturels. Ce sont les produits de dégradation des alkylphénols polyéthoxylés, utilisés, pour leurs propriétés tensio-actives. Ubiquistes dans l'environnement, ils se retrouvent préférentiellement dans les effluents urbains, industriels ou de stations d'épuration. Bien que biodégradables, ces composés sont bioaccumulables mais peu persistants dans l'environnement (Uguz *et al.*, 2003, Hecht *et al.*, 2004, Preuss *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2010). Une des molécules emblématique de cette classe de polluants est le 4-nonylphénol (4-NP). Il s'agit d'un perturbateur endocrinien qui affecte le développement embryonnaire (Schwaiger *et al.*, 2002, Lahnsteiner *et al.*, 2005, Yang *et al.*, 2008). De fortes teneurs en nonylphénols et nonylphénol-monoéthoxylés ont été mesurées chez le copépode, *Eurytemora affinis*, entre 3,4 et 6,4 µg/g de poids sec alors que les concentrations dans l'eau, dans la phase dissoute et les matières en suspension, montraient

des teneurs comprises en 0,4 et 2,2 µg/l (Cailleaud *et al.*, 2007b).

4.3 Polychlorobiphényl 126 (PCB126)

Les PCB présentent des propriétés diélectriques. Du fait de leur grande stabilité, ils ont été largement utilisés comme lubrifiants dans les installations électriques. Bien qu'aujourd'hui interdits, leur rémanence et leur large utilisation pendant des décennies en font un polluant ubiquiste ayant une diffusion continue. Les PCB coplanaires, comme le congénère PCB 126 (3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl), sont des composés chlorés-non-*ortho* et présentent une forte embryotoxicité et tératogénicité (Kim and Cooper, 1998, Foekema *et al.*, 2008). Les copépodes, quant à eux, présentent des contaminations de l'ordre de 383 à 1785 ng/g au niveau du bouchon vaseux (Cailleaud *et al.*, 2007a).

5. Méthodes

5.1 Prélèvement et acclimatation – Prélèvement et Dissociation

5.1.1 Prélèvement et acclimatation

Les copépodes *E. affinis* ont été collectés à l'aide d'un filet WP2 (maillage 200 µm) dans la zone oligo-haline de l'estuaire de Seine près du pont de Tancarville. Les organismes ont été maintenus dans des glacières afin d'être ramenés au laboratoire (Tableau 1 et 2).

Arrivés au laboratoire (LEMA), ils ont été transférés dans des aquariums et acclimatés aux conditions d'expositions (15 PSU, 18°C). Les individus sont ensuite synchronisés pour constituer la génération F0 (Figure 4 et 5)

Tableau 1 : prélèvements sur le terrain pour la culture de la souche laboratoire et les expositions aux contaminants chimiques. Les échantillonnages ont été effectués contre le courant de jusant à marée descendante

Date	Température	Salinité	Utilisation
27/09/2010	17°C	5 PSU	Lancement de la culture de copépode
07/10/2010	17,5°C	5 PSU	Culture de copépodes ; Expérimentation préliminaire pour déterminer les gammes de concentrations pour les CL50

05/11/2010	13°C	4,5 PSU	Culture de copépodes
18/01/2011	6°C	3 PSU	Lancement de la souche laboratoire de copépodes
02/02/2011	5°C	2,5 PSU	Expérimentation préliminaire pour déterminer les gammes de concentrations pour les CL50
17/02/2011	7,5°C		Alimentation de la souche laboratoire
04/04/2011			Lancement d'une nouvelle souche de laboratoire
16/05/2011			Prélèvement pour bioessai nauplien
13/10/2011	17°C	4,5 PSU	Prélèvement pour bioessai multigénération

Figure 4: Acclimatation de la génération issue de la pêche en milieu naturel des copépodes *Eurytemora affinis*

Figure 5 : Synchronisation des femelles et obtention de la génération F0

5.1.2 Prélèvement et Dissociation

Les échantillonnages des copépodes ont été réalisés au niveau de l'embouchure de la Seine (Figure 1) deux heures et 20 minutes après la pleine mer à l'aide d'un filet WP2 (maillage 200 μm). Les paramètres physico-chimiques sont résumés dans le tableau 2. Un prélèvement de la colonne d'eau est effectué à une profondeur de 2 mètres à l'aide d'une bouteille Niskin (Figure 2).

Afin de dissocier les copépodes des matières organo-minérales, trois étapes de filtration (porosité : 1,2mm) successives sont effectuées avec remise en suspension des copépodes dans un volume d'eau physiologique (NaCl , 9 g.L^{-1}) entre chaque filtration. Puis les copépodes sont concentrés sur deux filtres de cellulose/nitrate Sartorius de porosité 1,2mm et pesés.

Tableau 2 : Campagne et paramètres physico-chimiques de l'eau lors de la pêche des copépodes pour le dénombrement des microorganismes associés.

Paramètres physico-chimiques	Février 2009	Mars 2011	Mai 2011 *	Février 2012 *
Coordonnées GPS	49°N 26'18.9", 0°E 19'25.0"	49° N 226 189, 0° E 19 250	49°N26'.205, 0°E19'. 79	49°N 28' 30.26", 0° E 27' 48.65"
Horaire du prélèvement	Basse mer	Basse mer	2h20 après la pleine mer	2h20 après la pleine mer

Température	NA	NA	NA	6,9°C
Salinité	NA	NA	NA	1,3
Matière en suspension	NA	NA	NA	100 mg.L ⁻¹

5.2 Préparation des solutions d'exposition

Les solutions mères de contaminants utilisées lors des expositions ont été préparées au laboratoire EPOC, groupe LPTC à l'Université de bordeaux 1. Le solvant utilisé est l'acétone.

5.3 Analyse des contaminants dans les milieux d'exposition

Il a été choisi de doser la quantité réelle de chaque contaminant présent au cours des expositions semi statiques avec un prélèvement pour analyse dans le milieu d'exposition à T0 et 2h après le renouvellement du milieu d'exposition. La teneur en 4-NP dans les milieux est dosée à l'aide d'un GC/MS et le PCB 126 et le B(a)P à l'aide GC-ECD.

5.4 Bioessai mortalité sur le stade adulte (CL50, 48h)

Le protocole d'exposition a été établi suivant les recommandations de la Norme ISO/CD 14669 « Water quality – Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea) ». Nous avons tout d'abord effectué des expositions sur un petit nombre de réplicas de copépodes adultes (n = 2) afin de déterminer la durée d'exposition ainsi que la gamme de concentrations qui sera utilisée en routine. Nous avons observé une relation-dose / durée d'exposition / réponse pour chacun des composés. Le B(a)P montrait une toxicité plus prononcée que le 4NP et le PCB 126 ce qui va dans le sens des résultats trouvés dans les banques de données toxicologiques. Dans un second temps, nous avons redéfini une gamme de concentration et de nouveau effectué un test d'exposition en doublant le nombre de réplicas afin de (1) évaluer la répétabilité de la méthode et (2) déterminer une première valeur de CL50 pour ce composé à 48h. Puis, pour chaque contaminant d'intérêt, nous avons comparé les CL₅₀-48h¹ obtenues à l'issue d'expositions

¹ Concentration létale pour 50 % des individus après 48 h d'exposition

aigues, chez des lots d'individus exposés pendant 7 jours (i.e., un tiers de leur vie) à des concentrations environnementales et des lots d'individus-non exposés.

5.5 Bioessai nauplien (6 jours)

Au cours du projet TOXSEINE (AO Seine aval 2008) nous avons développé un bio essai mortalité et croissance larvaire avec le copépode *Eurytemora affinis* afin d'évaluer les effets de composés chimiques sur la croissance et la survie du copépode, dont le principe a été amélioré pour ce projet :

- des femelles ovigères (i.e provenant du milieu naturel) sont isolées dans des pondeirs. Des nauplii (issus de la ponte des femelles) sont récupérés pour constituer un pool de femelles ovigères (F0),
- des femelles ovigères (F0) sont à leur tour isolées dans des pondeirs afin de produire des nauplii appartenant à la génération F1,
- les nauplii (F1) sont les organismes utilisés pour effectuer le bio essai larvaire.

Tous les organismes (isolés ou exposés) sont maintenus dans des conditions de laboratoire contrôlées (15 PSU et 18°C) et sont alimentés chaque jour avec l'algue *Rhodomonas marina* à raison de 15 000 cellules/ml.

Le bio essai embryo-larvaire se déroule sur 6 jours idéalement sur les 6 stades nauplien de cette espèce (de N1 à N6). Le principe du bio essai est décrit dans la figure 6.

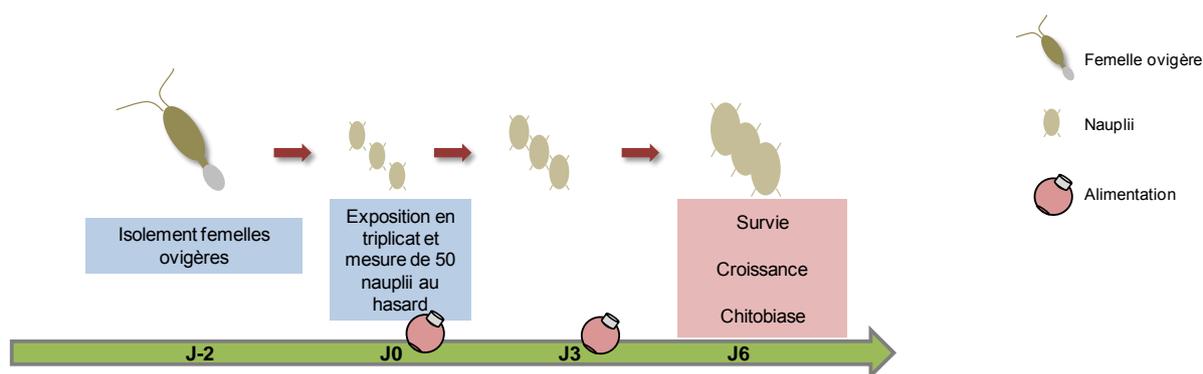


Figure 6 : Principe du bio essai larvaire croissance-mortalité avec le stade nauplius d'*E.affinis*

Les paramètres mesurés à l'échelle individuelle sont : la croissance, l'activité chitobiase (activité enzymatique en lien avec la croissance) et la survie. La chitobiase est une enzyme libérée lors de l'apolyse (mue). Elle est située dans le fluide apolytique, et permet de cliver

les dimères et les trimères de N-acétyl-glucosamine (NAG) en monomères (Zou and Fingerman, 1999 a). Elle est mesurée par fluorimétrie et exprimée en nmoles de MUF libéré par heure. La croissance (longueur du prosome à J6 – longueur du prosome à J0), la survie, et l'activité chitobiase sont mesurées à J6 selon le plan expérimental décrit figure 7

Figure 7: Plan expérimental du bio essai larvaire croissance-mortalité avec le stade nauplius d'*E.affinis*

5.6 Bioessai multi générationnel (2 mois)

Compte tenu de l'importance de la phase d'acclimatation des copépodes ainsi que de la disponibilité d'une nourriture adéquate (de bonne qualité), la préparation des expériences a été initiée dès le printemps 2011.

Au laboratoire les copépodes, issus de la pêche de Novembre 2011 ont été maintenus dans des bacs de 50 à 100 litres. La première acclimatation a été faite vis-à-vis de la salinité afin d'atteindre la salinité expérimentale de 15 PSU.

Pour lancer le bioessai multi générationnel :

- 15 jours après, les nauplii (F0) produits par les femelles pêchées et acclimatées ont été isolés et mis en culture dans un bac de 100 litres et dans 2 aquariums de 5L en

conditions contrôlées (T° 18°C, photopériode 12 :12). (Nouvelle génération produite en laboratoire)

- Après 12 jours l'apparition de femelles ovigères en nombre suffisant (20 à 40) a permis de lancer les différentes expositions (PCB 126, 4NP et B(a)P) dans des béciers de 2 litres (Figure 8) sur plusieurs générations F1, F2, en suivant le protocole mis au point par Souissi et al. (2010). Un suivi en milieu témoin et en milieu témoin acétone a été effectué en parallèle. Les contaminants ont été injectés dans les béciers en mode semi-statique (au moment du lancement de la manipulation et lors du renouvellement de l'eau de culture).
- Plus précisément, dès l'éclosion des œufs (F1), les femelles (F0) sont enlevées et le développement des nauplii est suivi jusqu'à l'apparition des nouvelles femelles ovigères (F1). Une partie de ces dernières est utilisée pour lancer la génération suivante (F2) et le reste de la population produite (F1) est fixée dans le formol pour analyser la composition de la population et mesurer les paramètres morphologiques et reproductifs des femelles. Le dénombrement des différents stades de la population à chaque génération a été réalisé à l'aide d'une loupe binoculaire et suivant une clef de détermination mis au point au LOG-Wimereux. Les différents paramètres morphologiques et reproductifs des femelles ovigères d'*E. affinis* ont été observés à l'aide d'un microscope inversé muni d'une caméra et d'un logiciel d'imagerie. Les mesures des traits individuels d'histoire de vie ont été réalisées à posteriori à l'aide d'un logiciel du traitement d'image (ImageJ).

Il est important de noter que les expositions au B(a)P et au 4NP dès le lancement de la F1 n'ont pu être suivies en raison d'une mortalité trop importante des femelles ovigères à la dose environnementale de 1X et ce dès le premier jour d'exposition. Les expositions ont été par la suite conduites à une concentration en B(a)P et 4NP de 0,5X (demi-dose), mais seuls les deux réplicats exposés au 4NP ont été menés jusqu'à la fin de la F2 (Tableau 2).

Compte tenu des mortalités observées avec certaines expositions, le suivi « multi génération » a été fait en deux étapes successives. Dans un premier temps nous avons suivi sur trois générations certains paramètres liés au trait de vie pour le PCB 126 et le témoin.

Par la suite, une deuxième série d'exposition au 4 NP (0,5 X) et témoin acétone a permis de réussir un suivi complet sur 3 générations qui s'est terminé le 10 mars 2012 (Figure 8).

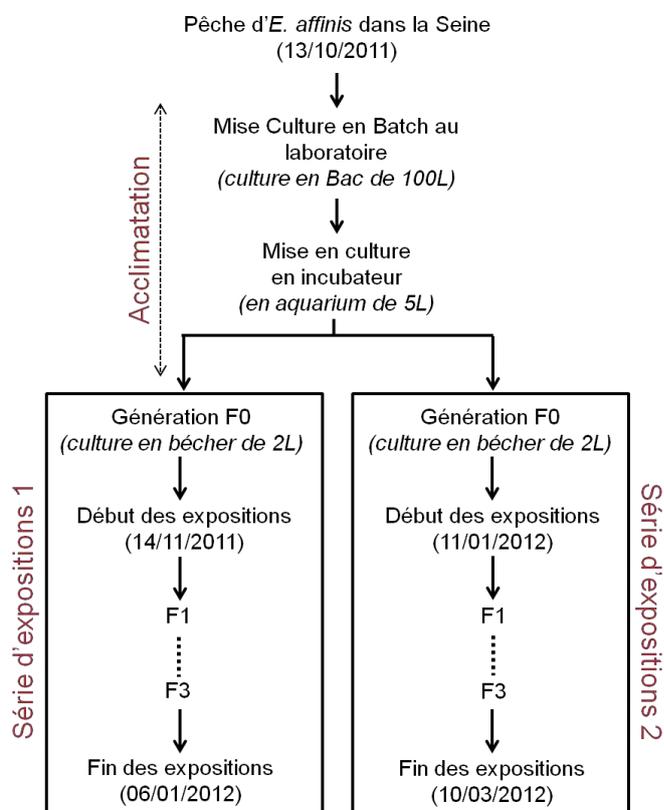


Figure 8 : Schéma synthétique des différentes étapes expérimentales allant de la pêche in situ, à l'acclimatation des copépodes et au suivi multi générationnel. A noter que deux séries d'expositions ont été réalisées successivement.

Tableau 2: Récapitulatif des différentes expériences réalisées et de leur succès. + : succès du suivi sur 3 générations et - : échec du suivi sur 3 générations.

Contaminants	Témoin		Acétone		PCB		4NP		BAP	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Réplicas	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
Succès de l'exposition	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Dose d'exposition			1X		1X		0,5X		1X et 0,5X	

5.7 Mise au point d'un protocole de dissociation des bactéries viables associées aux copépodes

La dissociation des bactéries associées aux copépodes repose sur deux étapes critiques, la séparation copépode et matière organique (MO), et la séparation entre les bactéries associées à la cuticule du copépode et le copépode lui-même.

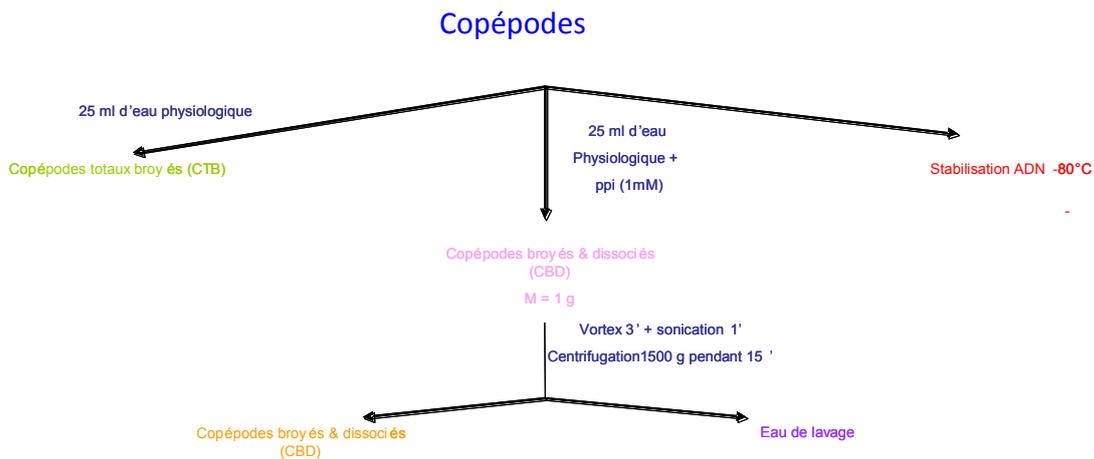


Figure 9: protocole de traitement des Copépodes pour le dénombrement de la flore microbienne totale et associée

Le dénombrement des bactéries associées aux copépodes est effectué sur trois fractions distinctes (figure 10).

- La fraction appelée « copépodes totaux broyés (CTB) » correspondant aux copépodes broyés au blender pendant 1 minute (min) à partir d'un des filtres (1^{er} filtre). Cette fraction permet l'étude de la communauté bactérienne totale associée aux copépodes : microbiote externe et la flore interne.

- Les deux autres fractions sont obtenues en dissociant les bactéries des copépodes après une agitation mécanique (3 min vitesse maximale) des copépodes préalablement resuspendu dans un tampon (eau physiologique + phosphate inorganique (1mM)). Puis un traitement aux ultrasons pendant 1min à 100 Htz suivi d'une centrifugation (1500xg pendant, 15 min) permet d'obtenir un surnageant, correspondant aux bactéries du microbiote externe (bactéries adhérant à la cuticule des copépodes), notée eau de lavage (EL). La fraction « Copépodes Dissociés Broyés » est obtenue après resuspension du culot dans de l'eau physiologique suivi d'un broyage au blender (1min). Cette fraction correspond aux bactéries présentes à l'intérieur des copépodes, flore microbienne interne mélangées à des débris de copépodes (figure 10).

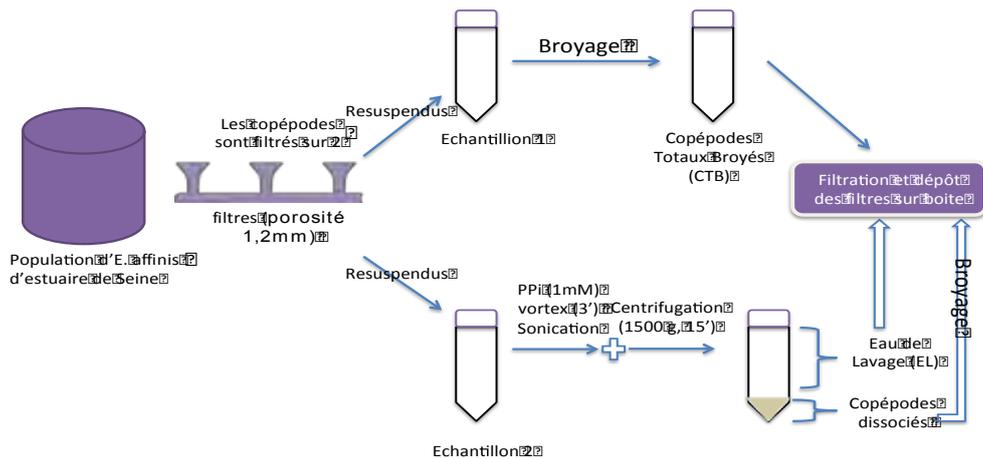


Figure 10 : Schéma du protocole de dissociation de la flore bactérienne associée au copépode *E. affinis*.

Un suivi du nombre de bactéries viables (méthode Live dead baclight) a permis d'optimiser ce protocole en choisissant le temps de traitement qui permet la dissociation du plus grand nombre de bactéries (Figure 11).

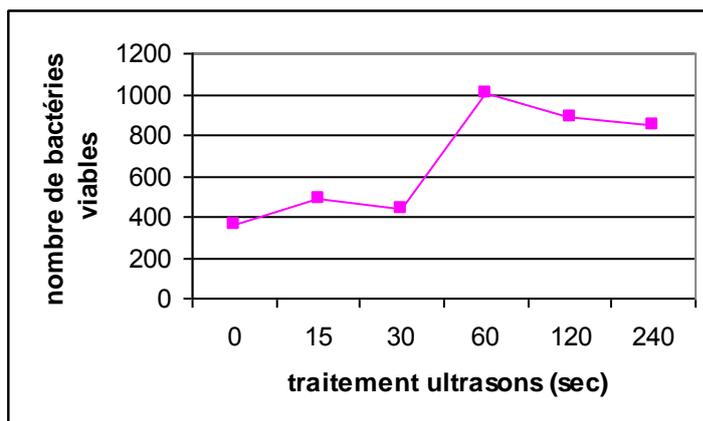


Figure 11: Dissociation de la flore bactérienne associée aux copépodes : optimisation du temps de traitement aux ultra sons (20 kHz ; 20W).

Le dénombrement sera donc effectué sur les copépodes non traités : flore totale dénombrée dans le broyat des copépodes (60 secondes, l'ultraturax à 4°C) et sur des copépodes broyés dont la flore bactérienne aura été préalablement dissociée afin d'évaluer le nombre de bactéries ingérées à l'intérieur du copépodes.

5.8 Colonisation des copépodes par *Vibrio* en mésocosme

Préparation d'une culture de *Vibrio* en phase de croissance exponentielle pour l'infection des copépodes

La souche COB 1 EL V 09, qui est issue du souchier (créé lors de la campagne de février 2012), a été isolée sur milieu riche Trypsic Soy Agar, Fluka Analytical , (TSA), 24h à 25°C. Un volume

de 7mL d'un milieu riche Trypsin Soy Broth, Fluka Analytical, (TSB) estensemencé à partir de 4 colonies et incubés dans un tube en plastique stérile de 15mL (Falcon). La culture est mise à l'étuve sous agitation rotative (25°C pendant 24h). Le suivi de la croissance est effectuée par un dénombrement sur milieu gélosé (TSA, 24h à 25°C) en déposant un volume de 10 µL, toutes les heures, en effectuant des dilutions (10^{-1} à 10^{-6}). Une lecture de la densité optique à 433 nm est effectuée en parallèle sur un spectrophotomètre (infinite M200 TECAN) et une plaque Greiner Bio-one Flat Bottom Transparent Polystyrol. Des triplicats ont été effectués.

Bioessai larvaire croissance mortalité – infection /Vibrio

Les copépodes utilisés pour cette expérience sont affranchis de l'empreinte environnementale de l'estuaire de Seine : Lors d'une pêche, des copépodes ont été maintenus dans des conditions stables (18°C, 15 PSU, rythme circadien 12h/12h) dans un aquarium. De cette pêche 500 femelles ovigères ont été placées dans un pondoir, lui même déposé dans un aquarium, afin que les *nauplii* s'y développent. Au bout de quatre générations d'élevage, 70 femelles ovigères provenant de cet aquarium ont été placées dans un pondoir (48h). Les *nauplii* issus des pontes sont répartis dans des tubes contenant 25mL d'eau de mer à 15 PSU (20 individus/tube). Ici deux conditions sont testées : contamination du milieu par une suspension bactérienne de *Vibrio* à 10^1 UFC.mL⁻¹ et à 10^6 UFC.mL⁻¹. La souche utilisée est l'une de celles qui ont été stockées lors de la campagne de février 2012 : la COB 1 EL V 09. Tous les jours les copépodes sont alimentés avec des algues, *Isochrysis galbana*, et toutes les 48h les tubes sont de nouveaux contaminés avec 25µL de la suspension testée. Avant chaque nouvelle contamination une mesure de l'activité chitobiase est effectuée ainsi qu'un dénombrement des *nauplii* et une mesure de la taille de deux pools.

6. Résultats scientifiques détaillés acquis au cours du projet

Dans un premier temps, les capacités d'acclimatation liées à la plasticité phénotypique ont été évaluées, pour chaque contaminant d'intérêt, en comparant les CL₅₀-48h² obtenues à l'issue d'expositions aiguës, chez des lots d'individus exposés pendant 7 jours (i.e., un tiers de leur vie) à des concentrations sub-létales et des lots d'individus-non exposés.

² Concentration létale pour 50 % des individus après 48 h d'exposition

Dans un second temps, nous comparerons plusieurs traits de vie à l'échelle de l'individu ≈ sur le développement nauplien (croissance), et à l'échelle population (croissance, densité, fécondité, sexe ratio, ETC...) entre lots d'individu témoins et lots d'individus exposés durant plusieurs générations, selon le protocole de Souissi et al (2010) à des concentrations environnementales (représentatives de la contamination dans la colonne d'eau).

6.1 Analyses préliminaires de la teneur réelle en 4-NP au cours des expositions

Les analyses préliminaires qui sont en cours dans le groupe LPTC de l'UMR EPOC, pour la mise au point du dosage du 4NP, du PCB 126 et du B(a)P (tableau 2), révèlent que la quantité réellement présente notamment du 4 NP est beaucoup plus faible que celle escomptée lors de l'injection du contaminant dans le milieu et qu'elle varie en fonction du temps de l'exposition (tableau 3)

Tableau 3 : Concentration dans le milieu d'exposition deux heures après le renouvellement du milieu (conditions semi statiques)

		Concentration en ng/L corrigée par rapport au blanc fibre		
Composés natifs	Composé deutéré	4NP 1000ng/L J-2	4NP 1000ng/L J4	4NP 10000ng/L J3
		2h après contamination	2h après contamination	2h après contamination
4-NP (135)	4 p-n NP C13 (113)	209	634	956
4-NP (135)	4-ter-OP d2 (137)	141	339	618
		rapport Aire Echantillon / Aire blanc fibre		
4-NP (135)		12	32	48

6.2 Capacité d'adaptation au stress Chimique

6.2.1 Mortalité et Dérive des CL50

Sur ce tableau 4 figurent les *CL50, 48h* déterminées sur une population d'*E.affinis* acclimatée et élevée au laboratoire (souche maintenue pendant 6 mois dans des conditions contrôlées). Ces concentrations létales pour 50% des organismes en 48h ont été déterminées sur des stades adultes dans un premier temps et puis sur des adultes exposés 7 jours à la dose environnementale de chaque contaminant cité précédemment. Il n'apparaît aucune dérive significative des *CL50, 48h* quelque soit le contaminant, la fenêtre de pré exposition de 7 jours n'est pas suffisante pour induire une plasticité phénotypique des individus face à la contamination.

Tableau 4: *CL50, 48h* calculées après des expositions du stade adulte d'*E. affinis*

contaminant	<i>CL50, 48h</i> ($\mu\text{g/L}$)	<i>CL50, 48h</i> après 7 jours d'exposition ($\mu\text{g/l}$)
B(a)P	25,3 +/-2	26,8 +/-2
4-NP	19,4 +/- 2	21,5 +/- 2
PCB 126	31, 7 +/-3	29,1 +/-3

6.2.3 Acclimatation au cours du développement nauplien

Les expositions simples (dose 1X et 5X) ont été réalisées en mode semi statique en *triplica* (Figure 12 a et b). Les paramètres suivis sont la survie par le dénombrement des survivants (à J2, J4, J6), la croissance par la mesure du prosome à J2, J4 et J6 moins la mesure à J0 et l'activité chitobiase.

Survie

Pour les expositions au B(a)P, aucune nauplii n'a survécu aux conditions d'expositions quelque soit la concentration testée. Le 4-NP n'entraîne pas de diminution significative de la survie par rapport au milieu Témoin acétone et ce quelque soit la concentration testée (1X ou 5X). Dans le cas des expositions au PCB 126, seuls les copépodes exposés à la dose environnementale (1X) ont survécu.

Croissance et activité chitobiase

Au niveau de la croissance des nauplii, des résultats similaires ont été observés pour les expositions au 4-NP et au PCB126. En effet un retard de croissance significatif apparaît pour les nauplii exposés au PCB126 et au 4-NP durant les deux premiers jours de développement du stade nauplien (Figure 12 a et b). Au bout de six jours d'exposition, ce retard n'est plus

significatif (Figure 12 a et b). Ces résultats sont confirmés par une activité chitobiase corrélée positivement à la croissance.

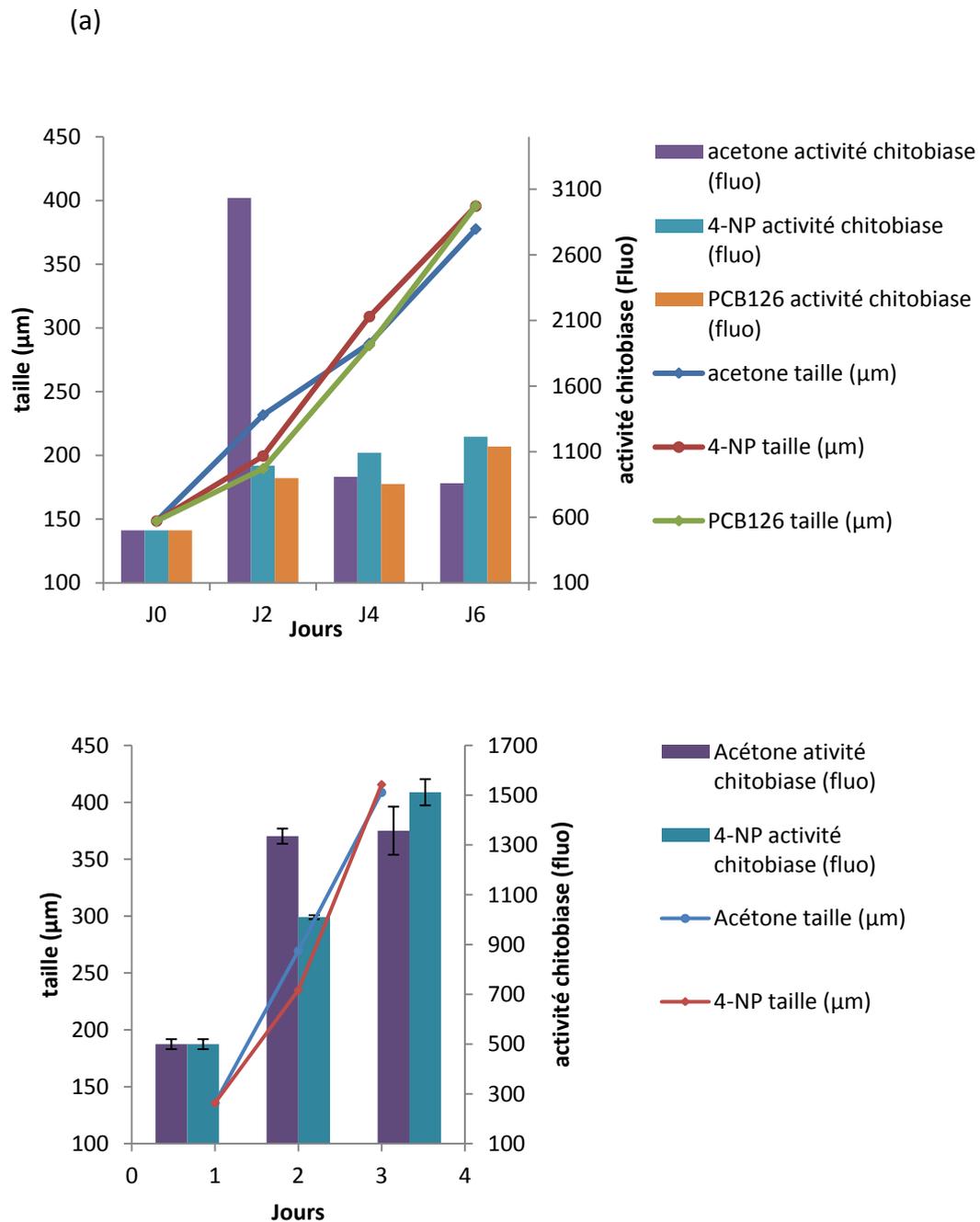


Figure 12 : Croissance (accroissement du prosome) et activité chitobiase chez les nauplii d'*Eurytemora affinis* exposés au 4-NP et au PCB126 (a 1X, b 5X) dans des conditions contrôlés (18°C, 15 PSU) au laboratoire.

Ces résultats semblent révéler une acclimatation au bout des 6 jours des nauplii à leur environnement et à la contamination car une activité chitobiase plus importante est

mesurée chez les individus exposés. Cette activité chitobiase plus élevée facilite la mue, nécessaire à la croissance des organismes. Au cours des expositions au 4-NP (1X et 5X) et au PCB 126 (1X), les nauplii ont tous atteint le stade copépodite (Stade de développement ultérieur).

L'augmentation ici de l'activité chitobiase (changement biochimique) chez les nauplii exposés permet aux individus de s'acclimater à cet environnement contaminé et d'atteindre néanmoins d'une part la taille optimale et d'autre part de passer dans le stade de développement suivant, le stade copépodite.

6.2.4. Adaptation au cours de la succession des générations

Les expériences sur plusieurs générations menés avec le B(a)P (1X ou 0,5X) n'ont pu être réalisées dans le cadre de ce projet, quel que soit la concentration le B(a)P s'est révélé très toxique pour les femelles ovigères et les nauplii du copépode *E. affinis* entraînant une mortalité trop importante.

6.2.4.1 Acclimatation aux conditions contrôlées (croissance et fécondité)

Afin de lancer des expositions sur plusieurs générations du copépode *E. affinis*, il est nécessaire d'acclimater les copépodes et plus précisément les femelles ovigères pêchées *in situ* aux conditions contrôlées et optimum de développement (18°C, 15 PSU, 12h :12h, *Rhodomonas salina*). Les femelles ovigères pêchées *in situ* présentent une taille supérieure aux individus acclimatés mais la taille reste conforme à la moyenne de la saison automnale (saison du prélèvement sur le terrain) (figure 13A). Par contre la fécondité moyenne (nombre d'œufs/femelle/génération) de ces femelles pêchées *in situ* (Figure 9B) est relativement faible par rapport aux femelles acclimatés (15 jours après le prélèvement). L'ajustement de la salinité à 15 PSU et l'utilisation d'une alimentation adéquate (*Rhodomonas salina*) ont permis l'apparition d'une nouvelle cohorte de femelles de plus petites tailles mais avec une meilleure fécondité (Figure 13B). Cette différence importante en terme de taille et de fécondité entre les individus *in situ* et la cohorte suivante confirme le nécessité d'acclimater les copépodes. Cette acclimatation permet d'obtenir des individus

« standards » avant de lancer les expositions en milieu contaminé sur plusieurs générations. A la fin de la période d'acclimatation (21 jours), des nauplii sont isolés pour obtenir des femelles ovigères homogènes en âge et issues d'une même génération (F0). Ces dernières sont utilisées pour lancer le suivi des traits de vie sur plusieurs générations au cours des différentes expositions (Figure 13). Au bout d'un mois d'acclimatation (équivalent à 2 générations), les femelles d'*E. affinis* (F0) ont une taille et une fécondité moyenne (Figure 13) nettement plus élevée.

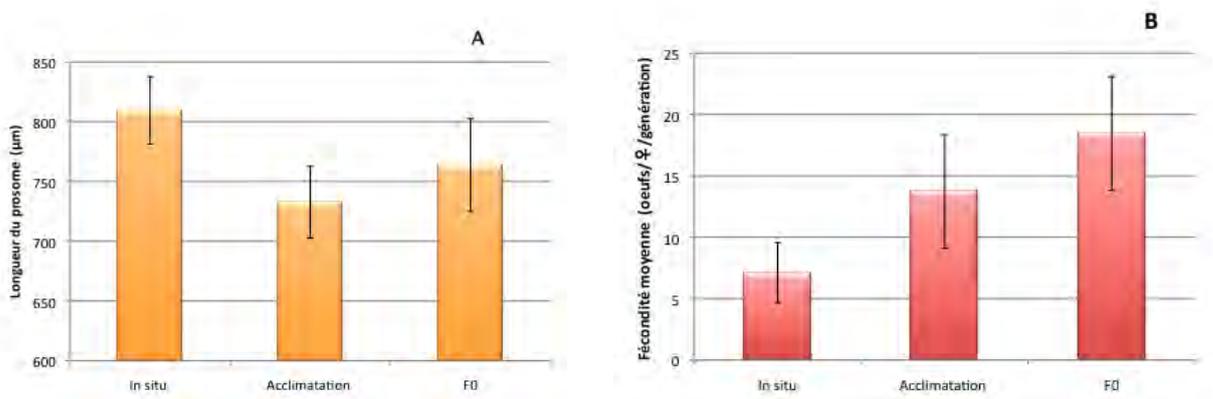


Figure 13 : Taille moyenne du prosome (A) et fécondité moyenne (B) des femelles d'*E. affinis* au moment du prélèvement (*in situ*), pendant la phase d'acclimatation (Acclimatation : 15 jours d'acclimatation au laboratoire ; F0 : 1 mois d'acclimatation au laboratoire).

6.2.4.2 Suivi des paramètres individuels (traits de vie) sur 3 générations successives

Croissance

Les « patterns » de variation de la taille moyenne des femelles au cours des générations sont très similaires dans les milieux témoins (Témoin et Témoin acétone) (Figure 14). La croissance des individus semble plus importante à la cinquième génération (F3) élevée au laboratoire dans des conditions contrôlées.

L'exposition au 4 NP des femelles induit une réponse plus tardive, à la deuxième génération F2. La taille moyenne des femelles (F2) représentée par la longueur du prosome est plus petite, mais la taille des femelles s'améliore à la génération suivante (F3) (Figure 10).

Les femelles exposées au PCB 126 ont une taille moyenne plus importante que les femelles témoins dès la première génération F1 (Figure 14), mais au cours des deux générations suivantes (F2 et F3) la longueur moyenne du prosome diminue. Ces résultats sont en opposition à ce que l'on observe chez les témoins.

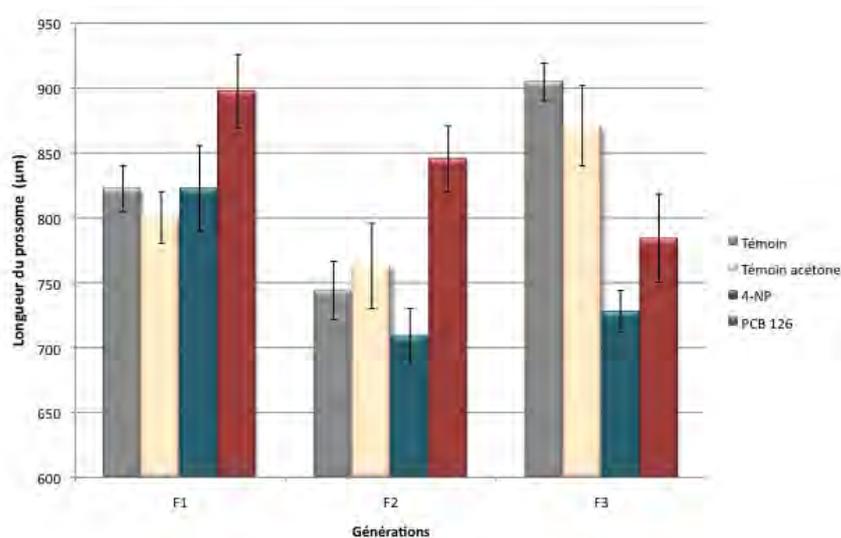


Figure 14 : Suivi multi générationnel (3 générations) de la taille moyenne (longueur du prosome) des femelles ovigères d'*E. affinis* exposées aux différents milieux (Témoin ; Témoin acétone ; 4-NP ; PCB126).

Fécondité

La réponse « fécondité moyenne » des femelles d'*E. affinis* est globalement similaire à celle de la taille. Toutefois, une différence entre les deux témoins apparaît, notamment une augmentation de la fécondité des femelles dans le témoin acétone (Figure 15). En effet, pour les copépodes femelles exposés au PCB 126 une fécondité très importante (40 œufs/♀) est observée dès la première génération (le double de celle des témoins) suivie d'une diminution progressive de celle-ci au cours des générations suivantes pour atteindre la valeur moyenne de 20 œufs/♀ à la génération F3. Lors des expositions au 4 NP, la fécondité des femelles est similaire à celle du témoin acétone durant la première génération exposée, mais on observe une fécondité moins importante (10 œufs /♀) à la génération F2. A la génération F3, la fécondité des individus exposés au 4NP est similaire à celles observées lors de l'exposition au PCB 126.

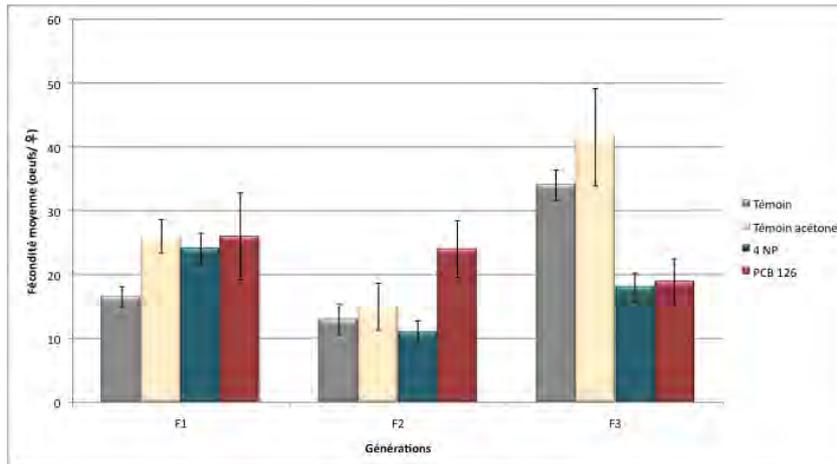


Figure 15 : Suivi multi générationnel (3 générations) de la fécondité moyenne des femelles ovigères d'*E. affinis* exposé aux différents milieux (Témoin ; Témoin acétone ; 4-NP ; PCB126).

Les deux traits de vie individuels, taille et fécondité, sont directement liés, une taille élevée correspond en général à une plus forte fécondité chez les copépodes. La figure 16 résume ces relations obtenues dans les différentes expositions. Les variations des deux paramètres taille et fécondité sont importantes et du même ordre de grandeur chez les témoins et chez les individus exposés au PCB126, avec des individus allant de 900 μm avec 35-45 œufs/♀ à 750-800 μm avec 15-20 œufs/♀. Par contre, chez les individus exposés au 4NP la variabilité de ces deux paramètres est plus faible traduisant globalement une réponse plus marquée sur toutes les générations observées. La relation taille-fécondité chez les copépodes exposés au 4 NP se caractérise par des individus plus petits au maximum autour de 800 μm pour une fécondité 25œufs/♀ et au minimum autour de 700 μm avec 10-15 œufs/♀.

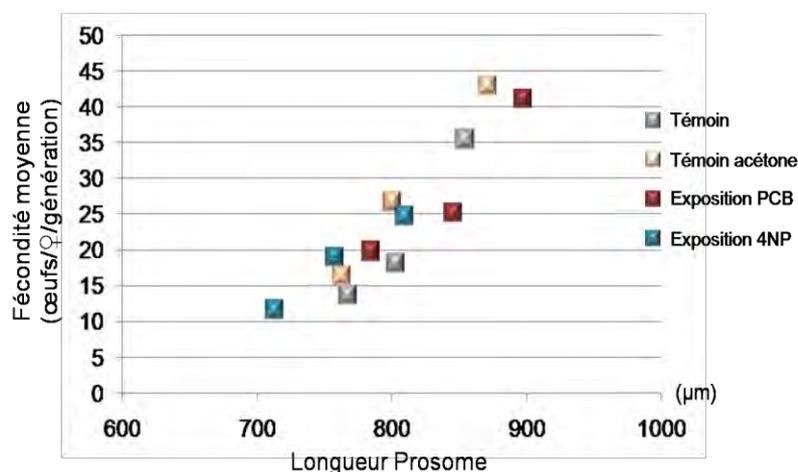


Figure 16 : Relations entre les moyennes de la fécondité et de la taille des femelles ovigères d'*E. affinis* exposé aux différents milieux (Témoin ; Témoin acétone ; 4-NP ; PCB126). Les valeurs moyennes par génération sont représentées par des symboles

6.2.4.3 Suivi des paramètres populationnels

Densité totale

Seule la population témoin a présenté une densité stable autour de 300-400 individus tout au long des générations, dans tous les autres cas d'exposition y compris avec le témoin acétone des fluctuations intergénérationnelles de densité ont été observées (Figure 17). Notamment une densité totale faible a été mesurée au cours de la génération F1 liée à une mortalité importante lors des différentes expositions. Au cours de la génération F2, les densités observées des différentes populations de copépodes ont été plus élevées en particulier dans la population exposée au 4NP avec une densité totale de 46 individus à la F1 à 632 individus à la F2. Par contre la densité totale des populations exposées au 4 NP et dans le témoin acétone s'est de nouveau effondrée à la troisième génération de copépodes passant de 632 individus à 212 individus pour le 4NP et de 448 à 88 individus pour la population acétone.

Le paramètre densité totale de la population dans le cas de l'exposition au PCB126 varie comme les traits d'histoire de vie individuels (taille et fécondité). En effet la densité totale de la population exposée au PCB126 augmente de façon progressive au cours des générations passant d'une population de 88 individus à la F1 à plus de 562 individus à la F3 (Figure 17).

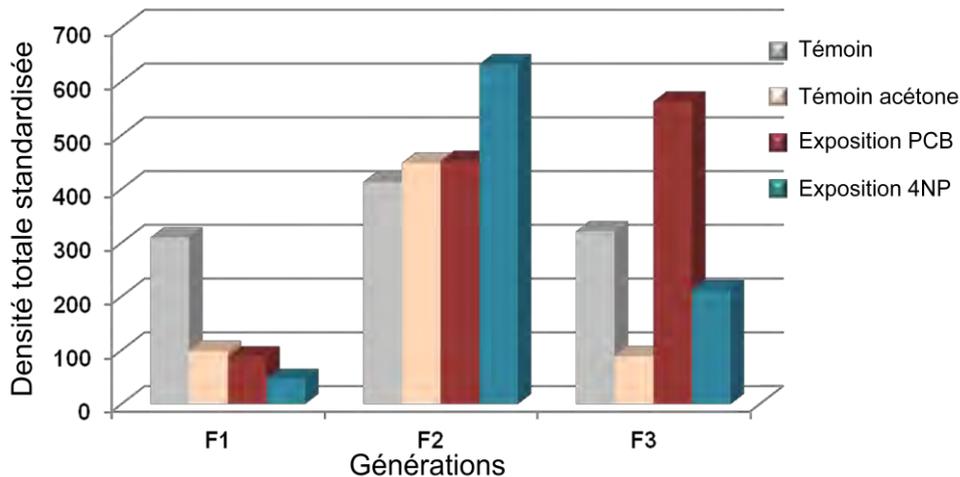


Figure 17 : Suivi multi générationnel de la densité totale (nombre d'individus dans 1,6 L) de la population standardisée par rapport à la production équivalente de 30 femelles ovigères d'*E. affinis* exposé aux différents milieux (Témoin ; Témoin acétone ; 4-NP ; PCB126).

Survie

La survie de la population témoin a été stable autour de 50-65% au cours des différentes générations. De même la survie des copépodes dans le milieu «témoin acétone » a été stable autour de 57% lors des deux premières générations, puis une chute importante de la survie (18%) est observée à la troisième génération F3 (Figure 18).

Les populations exposées au PCB 126 et au 4NP ont quant à elles montré une amélioration progressive de leur survie. Cette amélioration a été plus marquée chez les individus exposés au PCB 126 passant de 16% de survie lors de la génération F1 à près de 75% à la F3 (Figure 18).

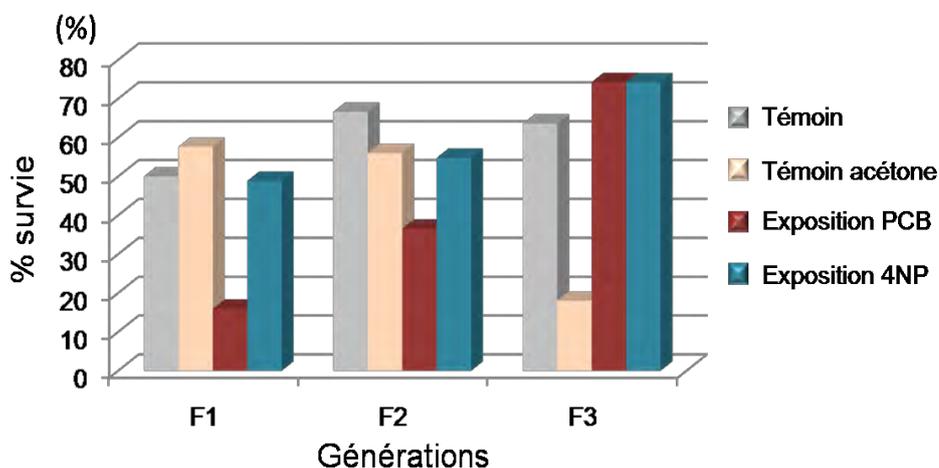


Figure 18 : Suivi multi-générationnel du pourcentage de survie de la population d'*E. affinis* exposé aux différents milieux (Témoin ; Témoin acétone ; 4-NP ; PCB126). La survie a été calculée par rapport à la production estimée selon le nombre de femelles ovigères incubées et leur fécondité moyenne.

Sex-ratio

Le sex-ratio des populations témoins a été en général équilibré entre les mâles et les femelles avec une très léger déséquilibre en faveur des mâles (Figure 15) ; avec des valeurs moyennes de 1,14 et 1,26 pour le témoin et le témoin acétone, respectivement.

Pour la population exposée au 4NP, le sex-ratio a été globalement en faveur des femelles avec une moyenne globale de 0,85 et une tendance à l'augmentation de la proportion des femelles au cours des trois générations (Figure 19).

Par contre, pour la population exposée au PCB126 une très nette augmentation du sex-ratio a été observé lié à une forte augmentation de la proportion des mâles. En effet, le sex-ratio de la population est passé d'une valeur de 0,7 en faveur des femelles lors de la génération F1 à une valeur de 2,5 nettement en faveur des mâles à la génération F3 (Figure 19).

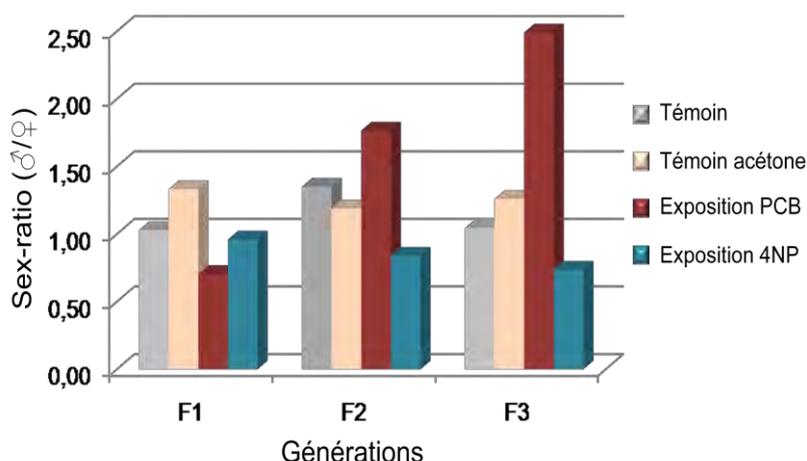


Figure 19 : Suivi multi-générationnel du sex-ratio (C5 et adultes des mâles par rapport aux femelles) de la population d'*E. affinis* aux différents traitements.

Les copépodes ont la capacité de réguler les fluctuations au sein de leur population en ajustant leur fécondité afin de compenser les mortalités subites. La figure 20 représente les relations entre la fécondité et la densité totale des populations exposées au PCB126 et au 4NP durant les 3 générations. Les relations obtenues montrent une corrélation très

significative témoignant de la régulation de la fécondité des femelles d'*E. affinis* par la densité de la population. En effet, les femelles d'*E. affinis* ont montré une capacité à compenser la baisse de la densité de la population par la production d'un nombre plus important d'œufs. Cette relation densité-dépendance a été plus marquée dans le cas de l'exposition au PCB126.

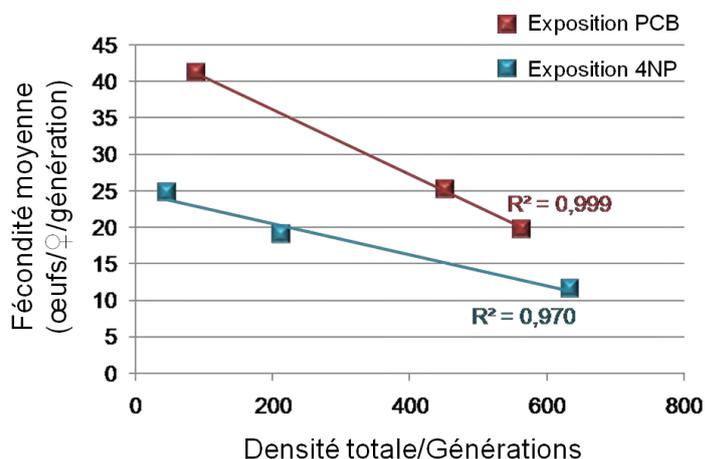


Figure 20 : Relations entre la fécondité moyenne et la densité totale de la population à travers les générations exposées au PCB et 4 NP.

6.3 Capacité d'adaptation » au stress biologique d' *Eurytemora affinis* et impact sur son microbiote

L'objectif de cette étude est de rechercher si stress biologique subit par les copépodes induit une modification de son microbiote, à savoir la flore microbienne commensale associées aux copépodes, en évaluant (i) l'occurrence de bactéries pathogènes (bactéries du genre *Vibrio*) et de bactéries d'origine fécale (*Enterococcus*, *E. coli*) (ii) les modifications de la diversité de la flore microbienne associée aux copépodes de Seine (étude in situ).

Ce travail repose sur des études *in situ* et des études en laboratoire menée dans un premier temps indépendamment pour le volet écotoxicologie et microbiologie puis dans un deuxième temps, une expérimentation en microcosme menée par les deux équipes a été effectuée afin d'évaluer la relation entre l'exposition au stress et la colonisation d'*Eurytemora affinis* par des bactéries pathogènes associées aux copépodes isolés d'eau de Seine.

6.3.1 Rôle des copépodes comme vecteur de bactéries pathogènes pour l'homme d'origine allochtones

6.3.1.1 Abondance de bactéries fécales *E. coli* et *Enterococcus* et *Vibrio spp* associées aux copépodes

Campagnes et méthodologie :

Quatre campagnes ont été effectuées dans la zone de l'embouchure au jusant (Voir Tableau 2). Les bactéries fécales *E. coli*, *Enterococcus* et *Vibrio spp* ont été dénombrées selon les normes ISO AFNOR en vigueur, sur une suspension de bactéries obtenues après application du protocole de dissociation des bactéries préalablement optimisé (Figures 10 et 11). En complément la structure des populations d'*E. coli* incluant la recherche de gènes de virulence et les phénotypes d'antibiorésistance a été réalisée.

Abondance de bactéries fécales et de *Vibrio spp* associées aux copépodes

Les résultats obtenus lors des 4 campagnes montrent que des bactéries d'origine fécale sont associées aux copépodes soit au niveau de leur cuticule (différence entre copépodes lavés et copépodes flore totale), soit ingérées à l'intérieur de l'organisme (copépodes lavés). Les entérocoques sont plus fréquemment isolés ce qui s'explique par leur meilleure résistance au stress osmotique (salinité). Cette association bactéries - copépodes serait donc un paramètre déterminant dans la dynamique de contamination en bactéries fécales dans cette zone de l'estuaire, car en fonction de la quantité de copépodes le nombre d'*E. coli* et d'*Entérocoques* associées à ces organismes rapporté au volume d'eau, peut être plus important que la densité de ces flores dans la colonne d'eau.

Tableau 5 : Abondance des bactéries indicatrices de contamination fécale (*E. coli* et *Enterococcus*) et *Vibrio spp* associé aux copépodes *Eurytemora affinis* en estuaire de Seine.

	<i>E. coli</i>			Enterocoques			<i>Vibrio spp</i>		
	Colonne d'eau UFC.100mL ⁻¹	Copépodes broyés dissociés UFC. mL ⁻¹	Copépodes Flore totale ^a UFC. mL ⁻¹	Colonne d'eau UFC.100mL ⁻¹	Copépodes broyés dissociés UFC. mL ⁻¹	Copépodes Flore totale UFC. mL ⁻¹	Colonne d'eau UFC .100mL	Copépodes broyés dissociés UFC. mL ⁻¹	Copépodes Flore totale ^a UFC. mL ⁻¹
Février 2009	1,5 10 ²	1,5.mL ⁻¹	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Mars 2011	10 ²	nd	3	2 10 ¹	16	2	10 ²	nd	nd
Mai 2011	6,5 10 ¹	nd	nd	5 10 ¹	< 10 ²	nd	Surface 3 10 ² fond 2,710 ³	11	46
Février 2012	< 10 ²	nd	8	2,8 10 ¹	nd	1,6	< 10 ²	< 10 ²	89

Dans le panache de la Risle, le potentiel de vecteur d' *E. coli* par *Eurytemora affinis* a été évalué à 1 10¹ UFC par Copépode (février 2009). En mai 2011, pour une quantité plus importante de copépodes analysée, ce rôle de vecteur de bactérie fécale n'est plus observé, cependant il a été possible d'observer des *E. coli* viables mais non cultivables associée à ces copépodes après marquage spécifique et observation en cytométrie en phase solide (Chemscan). Cette campagne a été réalisée à haute mer, l'entrée des eaux marines induisant une dilution de la contamination des eaux estuariennes. L'absence de bactérie fécale associée aux copépodes dans ces conditions suggère que l'association bactéries - copépode n'est pas pérenne, soit parce que les bactéries ne se maintiennent pas sous forme cultivable, soit parce qu'elles se dissocient du copépodes lorsqu'il évolue dans la colonne d'eau. Ces campagnes seront poursuivies pendant un an dans le cadre de la thèse de Teddy Lesueur.

Les copépodes sont aussi vecteurs de *Vibrio spp*, ce genre bactérien dont certaines espèces sont pathogènes pour l'Homme est autochtone du milieu estuarien. La densité de *Vibrio* associé est importante au regard de la concentration dans la colonne d'eau en surface.

Structure des populations d' *E. coli* associées aux copépodes et temps de survie

Afin de mieux appréhender le rôle de vecteur de bactéries fécales par *Eurytemora affinis*. Une caractérisation de la structure des population des *E. coli* associées aux copépodes a été effectuée sur la base de leur appartenance aux 4 groupes phylogénétique (A, B1, B2, D). Le tableau 2 montre que la structure des populations d'*E. coli* associées aux copépodes est voisine de celle présente dans la colonne d'eau, avec des souches appartenant majoritairement au phylogroupe B1, différentes de celle spécifiquement

retrouvées chez les hommes et les animaux. Ces résultats sont en accord avec ceux observés au laboratoire qui montrent que certains types épidémiologiques de souches d' *E. coli* appartenant au groupe B1 sont mieux adaptés à la survie dans les eaux (Ratajczak et al, 2010).

Tableau 6: Comparaison de la structure de la population d' *E. coli* associée aux copépodes avec des populations d'origine humaine ou animal. N nombre de souches appartenant au phylogroupe, N nombre total de souches

	Densité (UFC/100ml ou UFC/g)	N	Structure de la population % (n/N)			
			A	B1	B2	D
Colonne d'eau	$2,0 \pm 0,3 \cdot 10^2$	46	50 (23/46)	43 (20/46)	2 (1/46)	4 (2/46)
Copépodes	$1,1 \pm 0,5 \cdot 10^2$	47	36 (17/47)	57 (27/47)	0 (0/47)	6 (3/47)
Homme <i>Duriez et al 2001</i>			47	26	15	12
Animaux <i>Escobar_Paramá et al, 2006</i>			30	40	20	10

Les souches d' *E. coli* issues des copépodes sont des souches résistantes, voire multi résistantes aux antibiotiques, ce qui suggère une contamination par des souches d' *E. coli* probablement issues des rejets de la STEP de Tancarville située à proximité de la zone de prélèvement voire de la Risle (tableau 7 et figure 21).

Caractéristiques phénotypiques		Copépodes (n=15)
Résistance aux ATB		
Sensible		7
Résistant à 1 ATB		2
Multi-résistante		6
Profils de résistance aux ATB		
CHL		0
TET		2
NAL		0
Profils de multi-résistance aux ATB		
CHL/TET		0
CHL/NAL		0
TET/CF		0
NAL/CIP		1
AMX/TIC/TIM		3
AMX/TIC/NAL/CIP		0
AMX/AMC/TIC/TIM		1
AMX/AMC/TIC/CF		0
TET/AMX/TIC/SXT/STR		0
AMX/TIC/TIM/SXT/NAL		0
CHL/AMX/AMC/TIC/CF		0
CHL/TET/AMX/TIC/TIM		1
CHL/TET/AMX/AMC/TIC/TIM		0
TET/AMX/TIC/TIM/SXT/STR		0
CHL/AMX/AMC/TIC/SXT/STR/CF		0
TET/AMX/TIC/TIM/SXT/NAL/STR		0
CHL/TET/AMX/TIC/TIM/SXT/CF/CTX		0
CHL/TET/AMX/TIC/TIM/SXT/STR/K		0
Facteurs de virulence		
Absence de facteurs de virulence		2
<i>kspE</i>		7
<i>ompT</i>		3
<i>kspE/ompT</i>		3
<i>kspE/iutA</i>		0
<i>kspE/hly</i>		0
<i>ompT/iutA</i>		0
<i>kspE/ompT/iutA</i>		0
<i>kspE/ompT/hly</i>		0
<i>kspE/ompT/hly/iutA</i>		0

Tableau 7 : Caractéristiques phénotypiques des souches d' *E. coli* associées aux copépodes (campagne Février 2009)

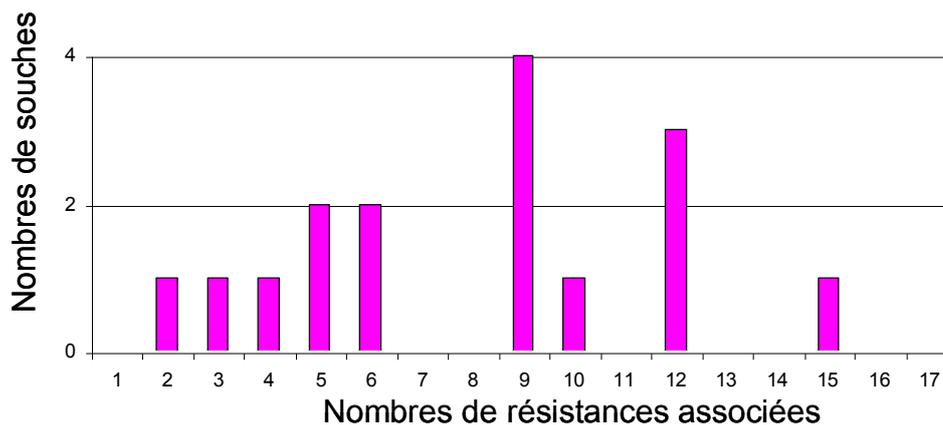


Figure 21 : Multi-résistance aux antibiotiques des populations d' *E. coli* associées aux copépodes (campagne février 2009)

Structure des populations de *Vibrio sp* associées aux copépodes

Lors des deux campagnes (mai 2011 et février 2012) 1 et 3 colonies apparentées à *Vibrio* pour 100mL filtrée ont été dénombrées à l'état libre dans la colonne d'eau alors que l'on dénombre ≈ 6 à 8 UFC.g⁻¹ de copépodes (figure 6). Le dénombrement sur les trois fractions obtenues après dissociation des bactéries associées à *E. affinis* montre que ces bactéries sont retrouvées dans la flore microbienne des copépodes. L'abondance de *Vibrio* étant significativement plus importante au niveau du microbiote interne : $\approx 7,5$ UFC.g⁻¹ de copépodes. Il n'existe pas de différence significative entre les deux campagnes, mise à part pour le microbiote interne (CDB) qui pourrait s'expliquer par une perte au moment de la dissociation, le protocole ayant été optimisé pour la campagne de février 2012. Pour cette campagne la somme des fractions des microbiotes interne et externe correspond approximativement à l'abondance de la flore totale (figure 22).

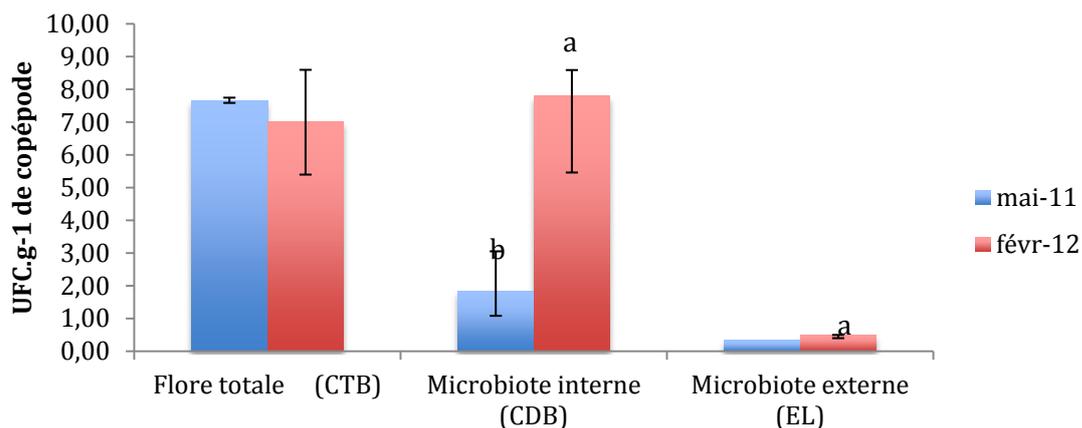


Figure 22 : Abondance des *Vibrios* et bactéries apparentées sur la base de critères culturels aux *Vibrio* rapportée au gramme de copépoede (en UFC.g⁻¹ de copépoede). a indique une différence significative entre la fraction CDB et la fraction EL ; b indique une différence significative entre CTB et CDB (P < 0,001).

A l'issue de la campagne de février 2012, 53 souches ont été isolées sur milieu TCBS et considérées comme appartenant au genre *Vibrio*. Afin de confirmer l'appartenance au genre *Vibrio*, une identification moléculaire a été effectuée à partir de l'analyse des séquences des ADNr 16S. Un total de 45 souches a été caractérisé dont 31 souches ont pu être identifiées sur la base de l'analyse des séquences des ADNr 16S. Les résultats montrent que 85 % des souches considérées comme *Vibrio* sur la base de l'aspect des colonies sur TCBS s'avèrent appartenir au genre *Aeromonas* (64,5% 20/31) et *Providencia* (19% 5/31). Seules 6 sur 31 souches appartiendraient au genre *Vibrio*. Ces souches de *Vibrio* ont été retrouvées dans la

fraction Eau de lavage (67 % des ADNr 16 séquencées analysées comme du *Vibrio* sont dans la fraction du microbiote externe).

6.3.2 Réponse des copépodes *E.affinis* à une infection par *Vibrio sp*

Culture de *Vibrio* pour l'infection des copépodes en mésocosme

Afin de préparer les suspensions qui serviront à infecter les copépodes, une courbe de croissance a été préparée avec une souche isolée lors de la campagne de février 2012 : COB 1 EL V09. Une unité de densité optique correspond à $2,5E+08$ UFC.ml⁻¹ (figure 23). La phase stationnaire est atteinte au bout de 10h et correspond à $3,00E+08$ UFC.ml⁻¹.

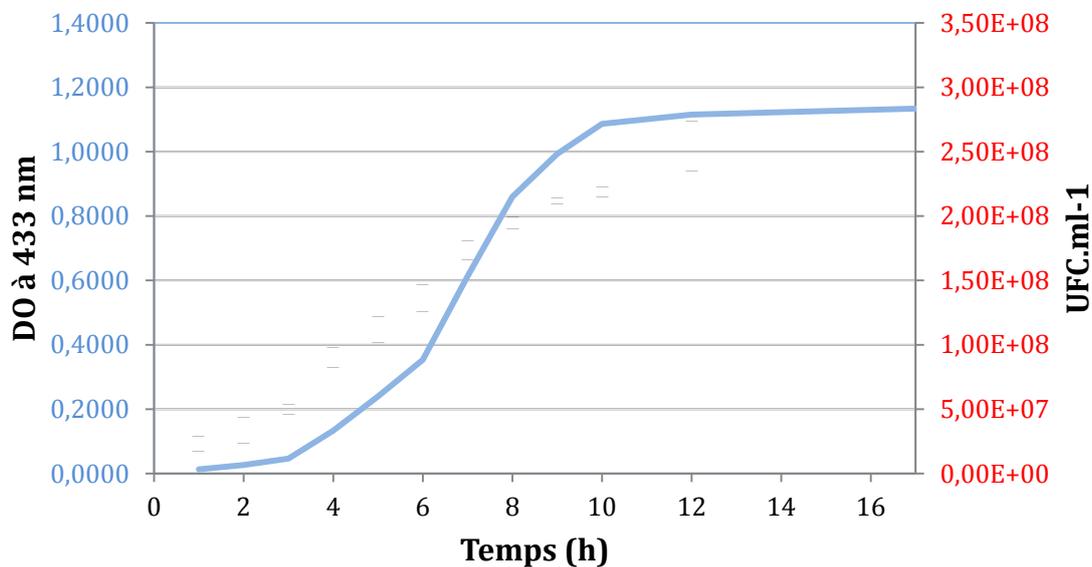


Figure 23 : Courbe de croissance de la souche Vibrio EL V09 sur milieu TCBS à 25°C en agitation

Survie, croissance et production de la chitobiase par *E. affinis* lors d'une infection par *Vibrio* en mésocosme

Le biomarqueur utilisé dans cette étude, la chitobiase, nous a permis de suivre les effets d'une contamination par une souche suspectée comme appartenant au genre *Vibrio* sur la mue et les croissances des copépodes.

Les résultats montrent que quelque soit la concentration bactérienne testée (10^1 UFC.ml⁻¹ ou 10^6 UFC.ml⁻¹), une augmentation significative du niveau de l'activité de la chitobiase par rapport au témoin est observée. Une différence significative est également observable entre

ces deux concentrations bactériennes, l'augmentation est plus forte pour la concentration 10^6 UFC.ml⁻¹. Au bout de 6 jours d'exposition, d'infection 10^1 UFC.ml⁻¹ ou 10^6 UFC.ml⁻¹, il est observé des niveaux d'activité chitobiase équivalents de l'ordre de 90 nmol de MUF.h⁻¹. Alors que l'activité de la chitobiase chez les copépodes, qui n'ont pas été mis en présence de *Vibrio*, restent à une valeur seuil d'environ 10 nmol de MUF.h⁻¹ (figure 24).

La croissance des nauplii est évaluée par la mesure la longueur de celle ci à J2, J4 et J6. Les résultats mettent en évidence une augmentation de la croissance après 6 jours d'exposition à *Vibrio* quelque soit la concentration testée. Au dernier jour d'exposition les copépodes ayant été contaminés avec la suspension bactérienne 10^6 UFC.ml⁻¹ sont environ deux fois plus grands que les *nauplii* non exposés (figure 24).

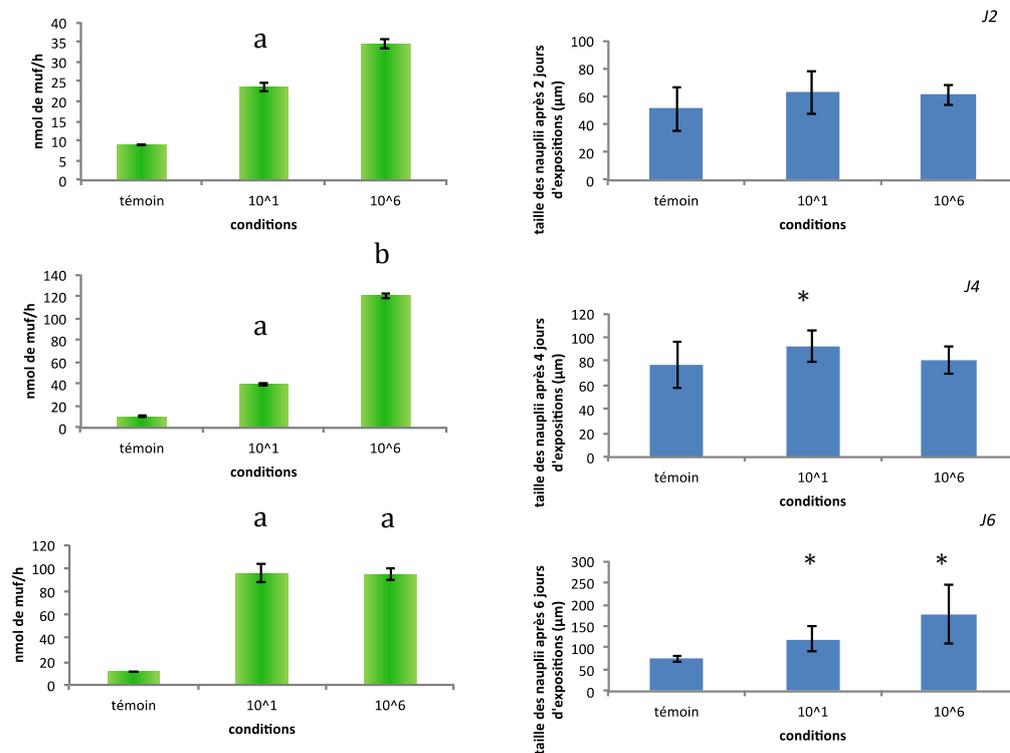


Figure 24: Conséquences de la colonisation des copépodes par *Vibrio* en mésocosme sur les niveaux d'activité de la chitobiase et sur la croissance des copépodes au cours du temps. a représente les différences significatives par rapport au témoin ; b : Différentes significatives entre les conditions 10^1 UFC.ml⁻¹ et 10^6 UFC.ml⁻¹ ; * : différence significative par rapport au témoin (p-value<0,05).

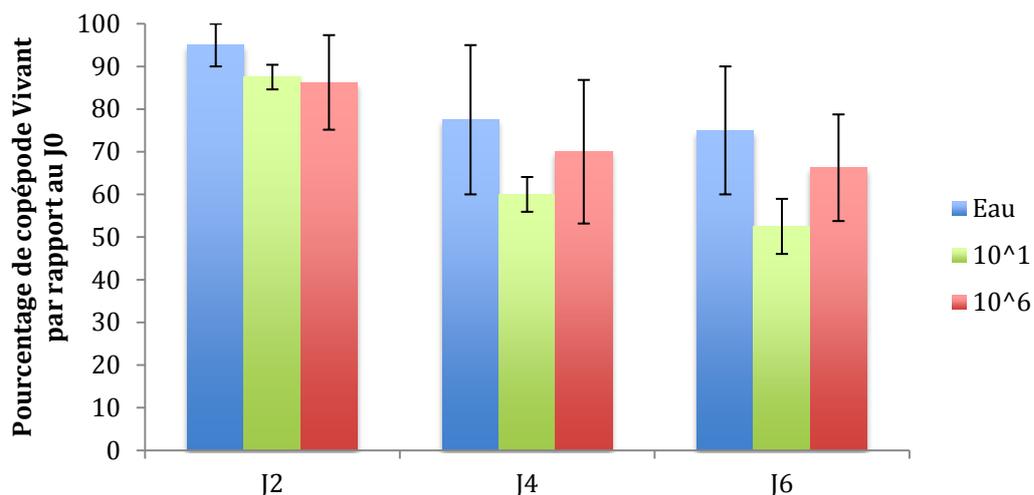


Figure 25 : Suivi du pourcentage de copépodes vivants au cours de l'infection par *Vibrio* en mésocosme.

Une légère diminution de la survie des *nauplii* est observé pour la concentration à 10^1 UFC.ml⁻¹ sans pour autant qu'elle soit significative. A la concentration de (10^6 UFC.ml⁻¹), les *Vibrio* n'ont pas d'effet significatif sur la mortalité des copépodes (figure 25).

La dilution contenant 10^1 UFC.ml⁻¹ a été choisie car c'est la concentration moyenne que l'on retrouve associée aux copépodes dans l'estuaire de Seine. La suspension contenant 10^6 UFC.ml⁻¹ à été choisie pour différentes raisons : Des études menées dans le cadre du programme Seine-aval ont mis en évidence que la concentration en *Vibrio* dans la colonne d'eau est portée par les matières en suspension (MES). Ces même travaux ont démontré que les copépodes accompagnent la dynamique particulières de ces MES. Donc lors de remise en suspension des MES, la quantité de *Vibrio* doit augmenter dans la colonne d'eau. De plus la concentration de 10^6 bactéries.ml⁻¹ est potentiellement pathogène. L'intérêt porté à *Vibrio* vient de la pathogénicité de certaines espèces. C'est pourquoi le fait que le zooplancton soit vecteur de ce genre bactérien est un risque potentiel pour le développement de pathologies notamment lors d'événements météorologiques extrêmes.

Divers travaux ont fait l'état des effets de différents contaminants chimiques sur les niveaux d'activité de la chitobiase chez le crabe (Zou et Fingerman., 1999). Peu d'études ont été réalisées concernant les effets d'une contamination par *Vibrio* sur la croissance et l'activité de la chitobiase chez les copépodes. Les résultats des expériences de colonisation d'*Eurytemora* par *Vibrio* montrent que les bactéries du genre *Vibrio* ont un effet positif sur les niveaux

d'activité de la chitobiase. Chez *E. affinis*, *Vibrio* semble accélérer le processus de mue sans affecter de façon significative la survie des copépodes, même à une concentration létale (10^6 UFC.ml⁻¹). Le fort pourcentage de survie des copépodes, même à des concentrations létales montre la capacité d'*E. affinis* à s'adapter ou à résister à de fortes concentrations de bactéries autochtones.

6.4 Discussion - conclusion

Les expositions ont été réalisées en mono contamination pour pouvoir appréhender la spécificité de chaque contaminant vis à vis des différents bio essais réalisés avec *Eurytemora affinis*. Même si elles ne sont pas représentatives de la complexité environnementale, elles serviront de base pour évaluer les effets des mélanges dans des études ultérieures. Le copépode *Eurytemora affinis* dans des conditions d'exposition simple au laboratoire, apparaît comme une espèce qui s'acclimate rapidement aux changements environnementaux que ce soient des changements de T° ou de Salinité (A. Ben Radhia Souissi, 2010) ou des changements de la qualité de l'eau (présence de molécules chimiques ou concentration importante en *Vibrio spp*). Cette étude a mis en évidence cette acclimatation rapide (en 6 jours) avec la mise en place d'une activité de mue plus importante pour récupérer la taille optimale à la fin du développement nauplien, nécessaire au passage vers le stade suivant du cycle de développement le stade copépodite. Dans le cas d'expositions prolongées en mode semi-statique, il apparaît également une plasticité phénotypique adaptative, avec au cours des générations une augmentation de la fécondité, de la taille des femelles ovigères, et une modification du sex-ratio selon le contaminant testé. On ne peut parler d'adaptation génotypique, car les organismes ont été exposés aux contaminants tout au long des trois générations, même si la contamination réelle des milieux est très faible d'après les analyses chimiques et bien en deçà de la contamination environnementale. Les premiers résultats de cette étude suggèrent également l'existence d'une association entre *Eurytemora affinis* et *Vibrio* au niveau de la cuticule sans affecter la survie du copépode. Ces travaux mettent en évidence le rôle probable de *Vibrio* dans la dégradation de la cuticule des *nauplii*, notamment au 6^{ème} jour, ce qui fournit probablement un apport énergétique à ces bactéries et accélère la croissance des copépodes.

7. Retombées opérationnelles directes et/ou indirectes du projet

Ce projet a permis d'apporter des éléments de réponse sur :

- L'adaptation (plasticité phénotypique) du copépode *Eurytemora affinis* et plus précisément sa capacité de résistance à la contamination chimique, notamment une acclimatation dès le stade nauplien face à la contamination (modulation d'activité enzymatique) et une plasticité phénotypique différente à la troisième génération exposée selon le contaminant testé.
- Le développement et l'utilisation d'un nouveau biomarqueur « La chitobiase » corrélé au trait de vie « croissance » du premier stade de développement du copépode.
- Le rôle probable d'*Eurytemora affinis* comme vecteur de *Vibrio* et de bactéries d'origine fécale dans les eaux de l'estuaire

8) Conclusion présentant notamment les perspectives de poursuite et/ou les questionnements nouveaux

Au cours de cette étude réalisée dans le cadre du projet COBAC, nous avons pu surmonter plusieurs difficultés liées à l'exposition des copépodes à des contaminants chimiques ou biologiques durant les premier stade de développement et sur plusieurs générations.

- L'acclimatation rapide des copépodes au stade nauplien a pu être observé au cours de l'exposition de la première (F1) au PCB 126 et au 4 NP, notamment avec une activité chitobiase plus importante chez les animaux exposés que les témoins corrélée à la croissance, afin de récupérer la taille optimum et de passer tous les stades nécessaires au développement nauplien et au passage « stade copépodite ».
- L'application du protocole multi génération accorde une grande importance à la phase d'acclimatation et les résultats préliminaires obtenus dans ce projet ont exigé un seuil minimal de 2 générations avant le début des expositions. Par conséquent, le suivi des 3 générations réalisé dans des conditions contrôlées avec des individus standardisés reflète les réponses adaptatives du copépode *E. affinis* aux différents contaminants. Ces premiers résultats donnent des réponses concrètes et des pistes de recherche intéressantes sur les

mécanismes individuels et populationnels susceptibles d'expliquer l'adaptabilité via la plasticité phénotypique des copépodes à certains contaminants présents dans la Seine.

- Les réponses du copépode *E. affinis* aux 3 contaminants sélectionnés dans cette étude ont été très différentes selon le stade de développement, la fenêtre d'exposition n'est pas la même: Les femelles ovigères après acclimatation semble le stade le plus sensible à la contamination (génération F1)
- Nos résultats confirment qu'un suivi sur 3 générations, représente un minimum pour pouvoir détecter une éventuelle adaptation à la contamination. Pourtant la plupart des études antérieures d'exposition des copépodes ne dépassent pas des observations à court terme et vont rarement au delà d'une génération. Ceci rend leur interprétation très difficile dans un contexte d'étude adaptative. Cependant, il est important de renforcer cette approche expérimentale et de poursuivre le suivi des populations sur 5 générations. En effet, les deux premières générations du suivi permettent l'observation de l'effet immédiat du contaminant et de l'effet maternel induit sur la génération suivante. L'observation du début d'une adaptation potentielle n'est appréciable qu'à partir de la 3^{ème} génération.
- Dans les cas des expositions au 4NP et au PCB 126, nous avons noté la forte plasticité de la population d'*E. affinis* de l'estuaire de la Seine, montrant une bonne régulation entre densité et fécondité, deux processus se déroulant aux échelles individuelle et populationnelle. Nous avons également montré une bonne capacité d'*E. affinis* d'ajuster sa croissance individuelle (taille) et sa production d'œufs. Ces mécanismes mis en jeu par *E. affinis* pour répondre à un stress chimique sont relativement similaires à ceux observés dans le cadre de l'étude d'un stress thermique ou salin (Ben Radhia – Souissi, 2010).
- Le résultat le plus marquant de cette étude est représenté par la réponse du sex-ratio au cours des générations. En effet, les réponses des organismes au 4NP et au PCB126 ont été opposées. L'exposition au 4NP a favorisé la production de femelles alors que l'exposition au PCB126 semble favorable à la production des mâles au bout de trois générations. Pourtant, la réponse immédiate au cours de la F1 des individus exposés au PCB126 a donné un sex-ratio en faveur des femelles, suggérant une mortalité inégale entre les deux sexes. Les générations suivantes (F2 et F3) ont montré un taux de survie plus élevé avec une production en faveur des mâles (2 pour 1 femelle) à la F3. Au cours de la même expérience, le sex-ratio chez les témoins est resté proche de l'équilibre, suggérant que le PCB126 agirait sur le déterminisme du sexe. En travaillant sur la même population d'*E. affinis* provenant de

l'estuaire de la Seine, Souissi et al. (2010) ont suggéré que certaines molécules produites naturellement (micro algues) et/ou des xénobiotiques pourraient intervenir dans le déterminisme du sexe. D'une façon générale, le déterminisme du sexe chez les crustacés peut être contrôlé génétiquement mais aussi influencé par les facteurs environnementaux (Fleminger 1985 ; Sillett & Stemberger, 1998 ; Gusmão & McKinnon 2009).

- Dans l'estuaire de la Seine, le sex-ratio observé *in situ* est souvent en faveur des mâles (Devreker et al., 2008). Ben Radhia-Souissi (2010) a suggéré que ce déséquilibre du sex-ratio de la population d'*E. affinis* de l'estuaire de la Seine représente une adaptation aux conditions locales. En effet, nos résultats obtenus dans le cadre du projet COBAC suggèrent que certains contaminants, telle que le PCB126 favorisent le déséquilibre du sex-ratio en faveur des mâles.
- Les résultats de cette étude qui se poursuit dans le cadre de la thèse de Teddy Lesueur a permis de montrer le rôle de vecteur de bactérie d'origine fécale, *E. coli* et *Enterococcus* par les copépodes *Eurytemora affinis*. Cette association, qui pourrait être transitoire, ne semble pas exercée une pression de sélection spécifique sur la population d' *E. coli* dont la structure est identique à celle de la population présente dans la colonne d'eau. Le rôle des copépodes devra être pris en compte dans la modélisation de la dynamique de contamination des eaux dans cette zone de l'estuaire.

Perspectives

- Ces premiers résultats expérimentaux sont très prometteurs et nécessitent d'être poursuivies et approfondies dans le futur pour une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu par les copépodes pour s'adapter à vivre dans un milieu contaminé telle que l'estuaire de la Seine.
- Le développement du biomarqueur d'immunotoxicité serait un plus chez *Eurytemora affinis*. Dans l'objectif de valider ce biomarqueur un suivi *in situ* serait à réaliser afin de mesurer l'activité Prophénoloxidase des copépodes *Eurytemora affinis* et d'évaluer l'occurrence de *Vibrio spp* associés.

- Le bio essai larvaire croissance-mortalité pourrait être appliqué sur le copépode exposé aux mêmes contaminants à des concentrations environnementales réalistes, en mélange avec la souche *Vibrio spp* isolé du milieu naturel pour évaluer la sensibilité ou l'adaptation du copépode à cette contamination multiple présente en Estuaire de Seine.
- Une étude de la structure des populations de *Vibrio* associées aux copépodes, notamment l'occurrence d'espèces pathogènes se poursuivra en 2013 notamment dans le cadre de la thèse de Teddy Lesueur
- **Liste des communications et/ou publications publiés et/ou soumises par l'ensemble des équipes du projet.**

Communications

Lesueur T., Souissi A., Boulangé-Lecomte C., Souissi S., Yen yu Pan, Petit F., Forget-Leray J. **Multi generational and individual effects of endocrine disruptors on growth and reproductive endpoints using the copepod, *eurytemora affinis*.** SETAC Berlin Mai 2012

- **Bibliographie des publications citées dans le rapport.**

Abarnou A., Burgeot T., Chevreuil M., Leboulenger F., Loizeau V., Madoulet-Jaouen A., Minier C., Blanchard M., Dauvin J.C., Hocdé R., Le Guellec A.M., Romaña L.A. et Teil M.J., 2000. Programme Seine-Aval, fascicule n°13, 35 p. Editions Ifremer, Plouzané (France).

Allan, J. D. and Daniels, R. E. 1982. *Marine Biology* 66: 179-84

Ben Radhia-Souissi A. (2010) Thèse de doctorat, Université Sciences et Technologies Lille1. 224 pp

Cachot J., Dégreumont C., 2009. 2.2 La génotoxicité : Quel risque pour les espèces aquatiques ? Fascicule Seine-Aval, p36.

Cailleaud K., Forget-Leray J., Souissi S., Hilde D., LeMenach K. & Budzinski H (2007a). *Chemosphere* 70: 270-380.

Cailleaud K., Forget-Leray J., Augagneur S., Lardy S., Souissi S. & Budzinski H. (2007b) *Chemosphere* 70: 281-287.

Coors, A., Vanoverbeke, J., De Bie, T., De Meester, L. (2009): *Aquat. Toxicol.*, 95: 71-79

Devreker D., Souissi S; Forget-Leray J. & F. Leboulenger (2007). *J. Plankton Res.* 2007 29(1):117-133.

Devreker D., Souissi S., Molinero J.C. and Nkibuto F. (2008). *Journal of Plankton Research*, 30: 1329-1342

Devreker, D., Souissi, S., Seuront, L., 2004. . *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 303, 31-46.

Fleminger A. (1985) *Marine Biology* 28:273-294

Forget-Leray, J., Landriau, I., Minier, C., Leboulenger, F., 2005. *Ecotox. Environ. Safe.* 60,

Fries et al., 2006. *J. Env. Eng.* 132,1338-1345.

Gusmão L.F.M. and McKinnon A.D. (2009) *Journal of Plankton Research* 31: 1101-1117

- Katona, S.K., 1971. . *Crustaceana* 21, 5-20.
- Kawecki T.J. & Ebert D., 2004. *Ecol. Lett.* 7, 1225-1241.
- Kimmel, D.G., Bradley, B.P., 2001. . *Exp. Mar. Biol. Ecol.* 266, 135-149.
- Morgan A.J., Kill P. & Stürzenbaum S.R., 2007. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1085-1096.
- Mouny, P., Dauvin, J.C., 2002. *Oceanologica Acta* 25, 13-22.
- Pruzzo et al.,2008. *Env. Microbiol.* 10,1400-1410.
- Ramade, F., 2002. Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement, 2ème édition. Dunod, Paris, 1152 pp.
- Reznick D.N. & Ghalambor C.K., 2001. *Genetica* 112-113, 183-198.
- Roddie, B.D., Leakey, R.J.G., Berry, A.J., 1984. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 79, 191-211.
- Signoretto et al., 2004. *Appl. Env. Microbiol.* 70,6892-6896
- Signoretto et al.,2005, *Appl. Env. Microbiol.* 71,2756-2761.
- Sillett K.B., Stemberger S. (1998) *Canadian Journal of Zoology* 76:596-600
- Souissi A., Souissi S., Devreker D., Hwang J. S., 2010, *Mar. Biol.* in press
- Uguz, C., Iscan, M., Ergüven, A., Isgor, B., Togan, I., 2003. *Environ. Res.* 92, 262-270.
- Zou et Fingerma., 1999

Crédit photo couverture : Souissi & Courcot, UMR CNRS 8187 LOG, Station de Wimereux
Pour tout renseignement, veuillez contacter la coordination scientifique : cdegremont@seine-aval.fr

Le GIP Seine-Aval ne saurait être tenu responsable d'évènements pouvant résulter de l'utilisation et de l'interprétation des informations mises à disposition.

Le GIP Seine-Aval est financé par :

