



HAL
open science

Étude de la qualité des milieux aquatiques : caractérisation des impacts écotoxiques

Thierry Burgeot, P. Bustamante, J. Fort, Marie-Agnès Coutellec, Didier Azam, Olivier Geffard, Arnaud Chaumot, J. Armengaud, L. Maltby, C. Minier, et al.

► **To cite this version:**

Thierry Burgeot, P. Bustamante, J. Fort, Marie-Agnès Coutellec, Didier Azam, et al.. Étude de la qualité des milieux aquatiques : caractérisation des impacts écotoxiques. Détection des impacts toxiques dans l'environnement - du terrain à la réglementation, Burgeot, T., Minier, C., Cuny, D., Cuny, M.A., Bispo, A., Grand, C. (eds), ISTE éditions, pp.70, 2018, 9781784054687. hal-02608339

HAL Id: hal-02608339

<https://hal.inrae.fr/hal-02608339>

Submitted on 16 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Auteurs : T. Burgeot, C. Minier, O. Geffard, M.A.Coutellec, W. Sanchez, P Bustamante, J.Fort, D. Azam, A. Chaumot, J. Armangaud, L. Maltby, J.M Porcher, A. Bado Niles

1.1 Contexte et enjeux	3
1.2 Stratégie d'application et études de cas	4
1.2.1 Les gammars comme espèce sentinelle pour la surveillance des milieux aquatiques	4
1.2.1.1 Introduction.....	4
1.2.1.2 Réponses biologiques disponibles chez <i>Gammarus</i> pour évaluer l'impact toxique des milieux	4
1.2.1.3 Biotests in situ validés et opérationnels chez <i>Gammarus</i>	6
1.2.1.4 Extrapolation et pertinence écologique des observations faites chez le gammare engagé	9
1.2.1.5 Conclusion	11
1.2.2 Changement d'échelle et évaluation du risque écologique chez <i>Lymnaea stagnalis</i>	12
1.2.2.1 Introduction.....	12
1.2.2.2 Réponses infra-individuelles.....	13
1.2.2.3. Réponses supra-individuelles des limnées : variation intra et inter-populations.....	17
1.2.3. Etat de santé des poissons en rivière pour comprendre les atteintes de la biodiversité ...	23
1.2.3.1 Introduction.....	23
1.2.3.2 Déploiement des biomarqueurs au sein d'un réseau de surveillance	24
1.2.3.3. Retour d'expérience sur l'utilisation des biomarqueurs dans un contexte d'investigation terrain ?	26
1.2.3.4. En marche vers l'application réglementaire des biomarqueurs	29
1.2.4. Recherche d'effets et de leurs causalités en milieu estuarien : l'itersexualité chez les scrobiculaires.....	30
1.2.4.1 Introduction.....	30
1.2.4.2 L'itersexualité chez <i>S. plana</i> : occurrence et sévérité	31
1.2.4.3. Facteurs confondants : taille, sex-ratio et parasites	31
1.2.4.4 Identification du mécanisme moléculaire	32
1.2.4.5 Recherche des composés responsables : l'approche EDA	33
1.2.4.6 Conclusions et perspectives	34
1.2.5 Les indicateurs écotoxicologiques chez les organismes marins : de la recherche à la réglementation pour la surveillance	34

1.2.5.1 Vingt-cinq années d'évolution méthodologique pour atteindre un consensus Européen	34
1.2.5.2. Développement méthodologique de l'approche intégrée de chimie et écotoxicologie en Atlantique Nord-Est.....	36
1.2.5.2.1. Processus d'application de la méthode intégrée chimie et écotoxicologie en surveillance à l'échelle nationale: Lancement du plan de surveillance DCSMM	40
1.2.5.3 Conclusion et perspectives.....	41
1.2.6. Mammifères et oiseaux marins, indicateurs de la contamination du milieu.....	41
1.2.6.1. Introduction.....	41
1.2.6.2 Caractéristiques des mammifères et oiseaux marins comme indicateurs de la contamination du milieu	43
1.2.6.3 Conclusion	50
1.3 Conclusion et perspectives.....	50

1. Etude de la qualité des milieux aquatiques: caractérisation des impacts écotoxiques

Mots clés: Organismes modèles, biomarqueurs, bioessais, surveillance eau douce et eau marine, risque écologique, défi d'échelle en écotoxicologie

1.1 Contexte et enjeux

La complexité des études dans des habitats naturels fait face à un grand nombre de verrous pour répondre à des enjeux à la fois scientifiques, sociétaux et réglementaires. La levée de ces verrous a nécessité des investigations itératives sur le terrain et en laboratoire afin d'intégrer les multiples interactions environnementales qui impactent un organisme. Nombre de ces verrous sont liés à la variabilité individuelle des réponses biologiques et aux capacités des organismes à s'acclimater aux conditions de leurs habitats pour y survivre, voire s'y reproduire, grâce à une cascade de mécanismes de régulations depuis une réponse moléculaire à ses conséquences physiologiques. Ils sont aussi liés aux multiples interactions physiques, chimiques et biologiques qui se produisent dans un milieu et qui varient dans l'espace et le temps.

Les programmes de surveillance ou bien les études du milieu aquatique s'appuient sur le développement des outils écotoxicologiques comme les biomarqueurs et les bioessais appliqués aux matrices environnementales (matrices sédiment, eau) à l'aide d'organismes modèles. Ils ont été construits à partir des concepts de toxicologie transposés dans le milieu naturel. L'histoire de la biosurveillance, en particulier en milieu marin, a bénéficié de plusieurs événements clés comme la création de la plate-forme américano-européenne Pollutant Response in Marine Organisms (PRIMO) pour le milieu marin en 1981, ou plus récemment en 2012 de la proposition de valeurs seuils représentatives d'un niveau de base et d'un niveau d'effet, pour les biomarqueurs et bioessais les plus pertinents en surveillance marine (convention régionale Oskar) et permettant une interprétation standardisées de ces outils à l'échelle de l'Atlantique Nord-Est [HYL 12].

Cet événement constitue une étape essentielle pour une application des outils issus de la recherche en écotoxicologie aquatique en biosurveillance. Il vient consolider et confirmer l'écotoxicologie comme discipline pilier de la législation européenne sur les produits chimiques et la qualité des milieux : règlement REACH, 1907/2006/CE sur l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques d'une part, Directive cadre sur l'eau (DCE, 2000/60/CE) et Directive cadre sur le milieu marin (DCSMM, 2008/56/CE) d'autre part. La création et le développement de sociétés savantes comme la société d'écotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA, créée en 1983) ou la plate-forme d'animation scientifique Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) regroupant le monde académique, industriel et gouvernemental qui a vu le jour il y a 26 ans aux Etats Unis sont aussi des lieux d'échanges scientifiques majeurs qui ont permis le développement de la recherche en écotoxicologie, et aider à l'émergence des outils de biosurveillance. Aujourd'hui de nouveaux fronts de sciences sont investis par l'écotoxicologie pour mieux comprendre, diagnostiquer et prédire l'impact des substances chimiques sur les écosystèmes, sur le long terme et à large échelle. Il s'agit d'intégrer la complexité de ces systèmes dans les recherches sur la réponse toxicologique aux perturbations chimiques, au laboratoire comme sur le terrain. Ainsi des questions, jusqu'ici le plus souvent

abordées par l'écologie, comme la variabilité intra et inter spécifique de la sensibilité aux stressors, les interactions biotiques et abiotiques dans les milieux, l'impact de l'organisation des paysages sur ces interactions, ou encore les perturbations sur les fonctions et les réseaux dans les écosystèmes sont prises en compte par la communauté des écotoxicologues.

Cette partie consacrée aux milieux aquatiques d'eaux douce et marine illustre comment, sur une grande variété d'espèces modèles, crustacés, mollusques, poissons, oiseaux et mammifères, sont développés puis mises en oeuvre des stratégies de biosurveillance de la qualité des milieux adaptées à la contamination chimique, qui tiennent compte de la complexité des milieux, de l'écologie des espèces, ainsi que des modes d'action des contaminants.

1.2 Stratégie d'application et étude de cas

1.2.1 Les gammarus comme espèce sentinelle pour la surveillance des milieux aquatiques

1.2.1.1 Introduction

Le genre *Gammarus* est un groupe de crustacés amphipodes très diversifié avec plus de 200 espèces que l'on rencontre dans l'ensemble des milieux aquatiques continentaux et côtiers [VÄI 08] et qui représente les espèces de macro-invertébrés dominantes, en termes de biomasse, dans de nombreux écosystèmes d'eau douce [MAC 97]. Les gammaridés jouent un rôle clé dans le fonctionnement des écosystèmes avec une action importante dans le processus de décomposition des détritiques et constituent un élément essentiel des réseaux trophiques. Enfin, ils sont connus pour être sensibles à la fois aux composés toxiques métalliques, mais également organiques [VON 04]. Ce sont des espèces largement utilisées en écotoxicologie, que ce soit au laboratoire ou sur le terrain [KUN 10] et ceci depuis de nombreuses années [JON 37]. De nombreux biotests ont été proposés pour étudier l'impact de sédiments, naturels ou dopés [MAL 90], [LAW 01], [WIL 06], d'effluents de stations d'épuration [GRO 01], [SCH 05] ou les eaux de surface, notamment via l'encagement (biomonitoring actif) [MAL 02], [BLO 06], [BAI 07a], [CRA 96], [CAR 07], [XUE 09a], [COU 11], [COU 14], [BES 13].

S'appuyant sur l'expérience acquise au cours de nos travaux avec cette espèce, ce chapitre illustre l'intérêt du gammarus pour évaluer l'impact des composés chimiques en milieu aquatique dulçaquicole. Nous présenterons tout d'abord une revue des réponses biologiques utilisées chez le gammarus pour évaluer la toxicité des milieux et les verrous scientifiques et techniques qui ont été levés pour interpréter les réponses biologiques observées dans le cadre de biotests appliqués *in situ* et à large échelle. L'un des défis majeurs est de traduire les réponses observées aux échelles sub-individuelles ou individuelles en termes d'effet sur la population et la communauté d'espèces potentiellement présentes dans le milieu étudié. En effet, pour donner une pertinence écologique à ces réponses ou marqueurs de toxicité, nous devons comprendre et lier les effets observés aux différentes échelles biologiques, et ce de façon mécaniste afin de proposer des outils prédictifs d'effet sur les populations. La modélisation offre un cadre scientifique et méthodologique pour atteindre cet objectif [MAL 99], [BAI 07a].

Chez *Gammarus*, l'utilisation de modèles comme outils d'interprétations et/ou de prédictions de l'impact de la pression chimique dans les milieux est bien avancée. Les travaux menés pour permettre une utilisation des biotests *in situ* avec le gammarus dans un contexte de biosurveillance sont présentés ci-après en particulier la définition de valeurs de référence, indispensables pour interpréter les réponses observées à de grandes échelles d'espace et de temps, ainsi qu'en termes d'impact sur les populations par extrapolation des impacts observés aux niveaux individuels sur les organismes encagés

1.2.1.2 Réponses biologiques disponibles chez *Gammarus* pour évaluer l'impact toxique des milieux

1.2.1.2.1. Traits d'histoire de vie

En Europe, deux espèces très proches morphologiquement, *Gammarus fossarum* et *Gammarus pulex*, sont principalement utilisées en écotoxicologie (Figure 1.1). La biologie de ces espèces est bien décrite. Chez la femelle, le cycle de reproduction est sous l'influence forte du cycle de mue [CHA 65]. La maturation des gonades (c'est-à-dire la croissance des ovocytes) et le développement des embryons dans le marsupium sont parfaitement synchronisés. Les juvéniles nouvellement éclos quittent le marsupium peu de temps avant la mue

des femelles, après laquelle, celles-ci pondent une nouvelle série d'ovocytes matures dans le marsupium qui sont immédiatement fécondés par le mâle. Dans le même temps, un nouveau lot d'ovocytes entre en vitellogenèse dans les ovaires. La spermatogenèse est beaucoup plus courte que le cycle de mue. Une période de sept jours est suffisante pour que le stock maximal de spermatozoïdes soit atteint après l'accouplement [LAC 11a].

De nombreuses études ont utilisé la reproduction chez les gammarus pour évaluer la toxicité de composés chimiques, avec comme marqueurs la fécondité [SUN 98], le comportement copulatoire [MAL 90], [COL 04], [BLO 05a], [LAW 01] et les anomalies gonadiques [GRO 01], [SCH 05]. Les réponses utilisées lors de ces biotests ne permettent pas d'identifier la cause physiologique (production d'ovocytes, anomalie ou retard du développement embryonnaire) ou hormonale des effets observés sur la reproduction. Un biotest [GEF 10] sur la reproduction permet de proposer un mode d'action potentiel impliqué dans les effets observés. Ce test, basé sur l'utilisation de femelles ayant un stade de mue identique et précis, offre un cadre d'interprétation des marqueurs mesurés (mue, fertilité, fécondité, croissance ovocytaire et développement embryonnaire) permettant de pointer l'impact de perturbateurs endocriniens sur la mue et la vitellogenèse. Le cycle de mue, la croissance ovocytaire et le développement embryonnaire sont hautement synchronisés et par conséquent prédictibles en conditions contrôlées. Par exemple, chez les femelles en stade de mue C2, 90% des embryons sont en stade 3 (caractérisés par la présence du céphalothorax) et la surface moyenne des ovocytes est de $106000 \mu\text{m}^2$. Ainsi, la mise en évidence d'une désynchronisation de l'une de ces réponses permet de suspecter une perturbation spécifique de la régulation endocrine de la reproduction.

D'autres traits d'histoire de vie sont utilisés comme marqueurs pour évaluer la toxicité de stress chimiques, comme la survie [TAY 91] et la croissance [MAL 94a], [BLO 96], [BLO 05b].

Figure 1.1 : Illustration d'un couple de *Gammarus fossarum*.

1.2.1.2.2 Marqueurs moléculaires

Dans une revue récente [TRA 14a] la synthèse des marqueurs moléculaires a été développée chez le genre *Gammarus*. Plus de vingt biomarqueurs protéiques sont disponibles, la métallothionéine qui traduit une exposition aux métaux [STU 92], [COR 01], [GEF 07], [GIS 12], l'activité enzymatique acétylcholinestérase [MCL 00], [XUE 07], [XUE 09a] informant sur l'impact d'insecticides de type carbamate et organophosphoré, ou encore l'activité d'enzymes de phase II [TUR 14] qui indique une activité de détoxification.

Sont également disponibles des biomarqueurs d'effets toxiques: la catalase [SRO 11], la glutathion peroxydase [TUR 14], la superoxyde dismutase [TUR 14], toutes indicatrices de la mise en place de systèmes de défense contre le stress oxydatif ; les protéines Hsp (Heat Shock Proteins) [SCH 06], [SCH 08], [BED 10a] qui constituent une réponse à un stress global ; la modulation des activités amylase, cellulase, estérase, β -galactosidase et β -glucosidase [DED 09], [CHA 13], en lien avec une perturbation de l'activité digestive ; et enfin, l'activité Na^+/K^+ ATPase [FEL 08a], [FEL 08b], [ISS 10] liée à une altération de la fonction d'osmorégulation. La majorité des études utilisant ces biomarqueurs a été réalisée en laboratoire dans un contexte d'évaluation de la toxicité de substances ou de mélanges. Très peu se sont intéressées à l'évaluation de la toxicité ou de la qualité des milieux [CRA 95], [SAN 09]. La mesure de biomarqueurs, tels que ceux cités plus haut chez des organismes prélevés ou exposés dans les milieux reste limitée et parfois critiquée [FOR 06], remettant en cause leur fiabilité et donc leur intérêt. Le principal verrou identifié est lié à l'influence de facteurs de confusion, biotiques et abiotiques, sur la réponse des biomarqueurs, interdisant d'établir de façon fiable une relation directe entre leur modulation et la toxicité des milieux.

La pertinence d'un biomarqueur pour la surveillance des milieux, réside dans sa sensibilité, liée à son affinité vis-à-vis des contaminants. L'absence de données génomiques et / ou protéomiques chez les invertébrés aquatiques d'intérêt environnemental a fortement limité le développement de méthodes directes et spécifiques pour la mesure et la quantification de biomarqueurs ces dernières années chez ces organismes. Les méthodes disponibles sont principalement adaptées des méthodes développées et validées chez les vertébrés [TRA 14a]. Pour les protéines dont la séquence et la fonction ont été conservées au cours de l'évolution (par exemple activité cholinestérasique et NaKTPasique), la stratégie basée sur le transfert des méthodes disponibles chez les vertébrés conduit à la proposition de biomarqueurs robustes chez les invertébrés [XUE 07], [MOS 10]. En revanche, pour les protéines dont la séquence ou la fonction physiologique n'ont pas été conservées au cours de l'évolution, cette stratégie conduit à une impasse. C'est par exemple le cas pour la mesure de protéines d'intérêt en biosurveillance des milieux aquatiques telle que la vitellogénine, protéine de réserve de l'œuf dont la modulation est indicatrice d'une perturbation endocrinienne de la reproduction chez les vertébrés inférieurs comme le

poisson. L'utilisation d'anticorps pour identifier cette protéine est une méthode sensible et largement reconnue chez le poisson (phénomène de féminisation). Cependant, ces anticorps, développés et disponibles chez les vertébrés aquatiques et certains invertébrés (dont des crustacés) [TUB 02] , [VOL 04] n'ont pas permis d'identifier cette protéine chez notre espèce modèle *Gammarus fossarum* [PNR 13]. Basées sur des techniques despectrométrie de masse, des méthodes analytiques spécifiques ont été développées pour identifier et quantifier cette protéine chez les invertébrés [MEN in press], [OTT 14], et notamment chez *Gammarus fossarum* [JUB 12a] , [JUB 12b]. Toutefois, l'application de cette méthode ciblée a également montré la grande variabilité inter-individuelle et la faible inductibilité de cette protéine lors d'exposition à un grand nombre de molécules chimiques [JUB 12c] , [SHO 14]. A l'inverse du poisson, ces limites compromettent l'utilisation de la vitellogénine comme biomarqueurs chez les gammaridés pour la surveillance des milieux aquatiques. Ces travaux ont mis en évidence la nécessité d'identifier de nouvelles cibles moléculaires impliquées dans la reproduction chez les gammaridés pour proposer, à l'instar des poissons, des marqueurs pertinents et surveiller l'impact des perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques sur les invertébrés.

1.2.1.2.3 Développement de biomarqueurs : L'Omiques chez *Gammarus*

Les nouvelles approches en protéomique, basées sur l'utilisation de spectromètres de masse ultra-rapides offrent aujourd'hui la possibilité d'avoir une vision sur l'ensemble des protéines impliquées dans la physiologie d'organismes, notamment chez des invertébrés comme le gammare. Aujourd'hui, l'identification de milliers de protéines sur n'importe quelle espèce n'est plus un verrou pour les laboratoires et plateformes développant de la protéomique à haut-débit [ARM 13]. Cependant, pour les espèces d'intérêt en science de l'environnement, qui sont le plus souvent « non modèles » d'un point de vue moléculaire, cette approche se trouve confrontée à une limite forte qui est le manque de séquences appropriées pour une annotation correcte de ces protéines. La recherche par homologie de séquences est l'approche classique, cependant elle ne permet d'identifier que les protéines les plus conservées, liées au métabolisme général et les protéines de structures, peu informatives de modes d'action toxiques. De plus, la fonction des protéines est prédite sur la base d'homologie des séquences, en combinant les connaissances et informations disponibles sur les fonctions de divers groupes taxonomiques qui sont en majorité des vertébrés.

Cependant, certains auteurs ont avancé que les gènes les plus impliqués dans les réponses aux stress environnementaux sont aussi les gènes les plus « taxon-spécifiques », comme démontré par les études en transcriptomique chez *Daphnia pulex* [COL 11]. Ainsi, des approches alternatives doivent être développées. Le séquençage du génome est l'approche la plus appropriée et pertinente pour créer une base de données protéiques fiable et exhaustive, toutefois, le séquençage des ARNm offre une alternative d'intérêt pour mener une identification rapide des séquences protéiques chez des espèces non modèles. La combinaison de la génomique et de la protéomique, appelée approche protéogénomique, constitue une stratégie de choix pour la découverte de protéines chez les espèces non modèles [ARM 14]. Cette approche a été mise en place pour la première fois chez un invertébré, ciblée sur les gonades de *Gammarus fossarum*, [TRA 14b]. Les auteurs ont pu identifier plus de 2000 protéines dans cet organe; 75 étant classées comme spécifiques de la femelle et 28 du mâle. Cependant, l'annotation fonctionnelle reste limitée à une annotation par homologie et là encore confrontée à l'absence d'information bien établie chez des espèces proches. Ce verrou peut être partiellement levé en combinant des approches d'écophysiologie et de protéomique comparative. En effet, pour l'ensemble des protéines identifiées chez le gammare, ayant ou non pu être annotées, leur fonction a pu être étudiée et validée en décrivant finement leur profil d'expression et d'évolution au cours de processus physiologiques cibles. Cette démarche a été mise en œuvre pour le processus d'ovogénèse et de spermatogénèse, afin de sélectionner certaines protéines comme biomarqueurs potentiels de perturbations endocrines [TRA 14b] , [TRA 14c].

1.2.1.3 La biosurveillance des milieux : mise en œuvre avec *Gammarus*.

1.2.1.3.1 Biotest *In situ*

La mesure d'effets via l'encagement d'organismes dans les milieux présente de nombreux avantages par rapport à la bio-surveillance passive (mesures sur organismes prélevés). Elle permet de réaliser une exposition contrôlée, en milieu naturel et à l'aide d'organismes précisément sélectionnés provenant d'une seule population connue [MAL 06] , [BAI 07b]. Cette approche *in situ* offre la possibilité d'établir plus facilement les liens entre les effets toxiques et les niveaux de contamination des milieux étudiés [CRA 07], tout en intégrant l'effet des paramètres environnementaux qui influencent la biodisponibilité des contaminants (e.g. température, pH,

dureté). Via l'encagement, l'ensemble des facteurs biotiques connus pour influencer la sensibilité et/ou le niveau des marqueurs de toxicité (e.g. âge, genre, état physiologique, reproduction, population et histoire de vie) est contrôlé, limitant les biais d'interprétation en terme d'effets toxiques [LIB 07]. Les tests *in situ* reposent sur l'étude de traits d'histoire de vie (survie, croissance et reproduction), de marqueurs physiologiques (taux d'alimentation et scope for growth) ou moléculaires. Les tests *in situ*, utilisant les gammaridés, ont été mis en œuvre pour étudier une large gamme de sources de contamination, comme les stations d'épuration [LAC 11b], les rejets industriels [DED 09], mais également des approches à l'échelle de bassins versants [JUB 12c], [COU 2011].]La réponse la plus largement étudiée est le taux d'alimentation, qui a été utilisée pour évaluer l'impact de rejets de piscicultures [VEE 92], de traitements par pesticides [MAL 08], d'eaux usées [MAL 02], [BUN 11], de rejets miniers [MAL 02] et d'effluents industriels [MAL 02], entre autres.

1.2.1.3.2 Variabilité des facteurs environnementaux: définir des valeurs seuils de référence et des valeurs seuils d'effet.

De nombreuses études ont montré que les facteurs abiotiques influencent le niveau de base des biomarqueurs et traits d'histoire de vie, constituant une limite forte pour les interpréter de façon fiable en termes de toxicité chez les organismes encagés. Aujourd'hui, pour la majorité des mesurés réalisées *in situ*, l'impact de ces facteurs, souvent appelés « facteurs de confusion » ne peuvent être pris en compte, sauf à restreindre cette approche à la comparaison de sites présumés de référence et de sites impactés présentant des paramètres physico-chimiques similaires (e.g. amont et aval d'une source de contamination identifiée). Cette stratégie interdit les études à des échelles plus larges et ne permet pas de prévenir avec certitude le biais lié à l'influence des facteurs de confusion, même à une petite échelle spatiale [COL 11]. L'auteur [HAN 10] montrent clairement comment la compréhension de la variabilité naturelle des marqueurs de toxicité améliore leur fiabilité et limite le risque d'une interprétation erronée, en tant qu'impact toxique, d'une modulation naturelle d'une réponse. Permettant de s'affranchir de la nécessité d'une mesure témoin, l'utilisation de valeurs seuil indépendantes des paramètres physico-chimiques des milieux, offre la possibilité d'évaluer la qualité d'une eau sur des stations isolées, déconnectées et réparties sur une large échelle géographique, tout en garantissant de pouvoir les comparer et les prioriser. Pour disposer de ces valeurs seuils, différentes stratégies ont été appliquées chez *Gammarus* en s'appuyant sur l'analyse de la variabilité naturelle des marqueurs de toxicité. Nous allons ici présenter les différentes approches utilisées pour définir ces valeurs seuils de référence pour une régulation physiologique normale (niveau de base) et des valeurs seuils d'effets qui provoquent un stress.

Approche empirique – une des approches pour limiter les faux positifs liés à l'influence des facteurs de confusion environnementaux est de définir les valeurs de référence (niveaux de base) des marqueurs en intégrant leurs variabilités spatiale et temporelle observées sur des sites contrôles [HAG 008]. Les mesures effectuées sur des sites de référence, à différentes saisons et dans divers bassins hydrographiques ont montré que chez *G. fossarum*, l'influence des principaux facteurs environnementaux (température, dureté) sur l'activité acétylcholinestérase (AChE) [XUE 09a] et les niveaux de dommages à l'ADN (test des Comètes) sur les spermatozoïdes [LAC 11a] était très faible. Dans ce contexte et de façon empirique, une variabilité « normale » pour ces deux biomarqueurs a été proposée comme référentiel, intégrant les réponses observées pour les différentes stations de référence et pour les différentes saisons (Figure 1.12). Les résultats d'activités AChE présentés dans la (figure 1.2) et obtenus chez des gammarés encagés 2 semaines en amont et aval de sources de contamination offrent un exemple de l'intérêt de disposer de valeurs seuil pour éviter les faux positifs et négatifs.

Figure 1.2: Utilisation de valeurs seuil pour l'interprétation des mesures du biomarqueur AChE chez *Gammarus* en biosurveillance. Sept campagnes d'encagement *in situ* (deux semaines) dans des stations en amont (gris) en aval (noir) de sources de pollution sont présentées. Les étoiles indiquent des différences significatives entre les mesures en amont et en aval. La gamme de variabilité de la mesure de l'AChE hors contamination (pointillés) a été établie par [XUE 09a]. Les niveaux d'inhibition influant sur alimentation et locomotion sont évalués à partir de l'étude de [XUE 09b].

Modélisation – Chez le gammaré, la définition empirique de valeurs seuils de référence et de valeurs seuils d'effets, basée sur l'observation de la variabilité naturelle des réponses biologiques utilisées comme marqueurs, est problématique, voire impossible pour un grand nombre de réponses individuelles, comme le cycle de mue, la croissance et le taux d'alimentation étant donné leur lien fort avec la température. Modéliser l'influence des facteurs abiotiques (e.g. la température) offre l'opportunité de l'intégrer dans l'interprétation des réponses biologiques et ainsi de comparer la modulation des marqueurs quelles que soient les conditions environnementales.

L'influence de la température sur le cycle de mue-reproduction chez la femelle de *G. fossarum* a été formalisée par modélisation [PÔC 90]. Le modèle de distribution des stades de mue chez les femelles a été développé à partir d'observations réalisées sur des femelles exposées sur des sites de référence, à des températures variables et pour une durée déterminée. Il permet, suite à une exposition sur le terrain et à l'aide des températures enregistrées au cours de celle-ci, de prédire la distribution en stades de mue dans laquelle les femelles doivent se trouver, si la station est considérée comme non contaminée chimiquement. Ainsi, ce modèle offre l'opportunité d'appliquer sur le terrain le test de reproduction [GEF 10] sans expérimenter, en même temps, des stations définies *a priori* comme référence. L'utilisation à large échelle de biotests et de réponses influencés par la physico-chimie du milieu (comme la mue) devient possible et interprétable en terme de toxicité. L'étude de cas illustrée dans la figure 1.3 montre comment l'utilisation du modèle développé permet de conclure sur les causes probables du retard de mue observée entre deux stations. Les différences dans la progression de la mue observée entre les rivières Sensée et Deule s'expliquent par la différence de températures entre les stations au cours de l'exposition. En revanche, le retard enregistré sur la station aval de la Saône, par rapport à la station amont, est manifestement un impact de la qualité de l'eau dégradée dans cette station.

Figure 1.3 : Distribution des stades de mue chez les femelles *Gammarus* exposées durant 15 jours sur deux rivières du Nord de la France (A : Sensée et Deule) et en amont et aval d'un rejet de station d'épuration sur la Saône (B). Pour chaque site étudié, est donnée la distribution d'une part obtenue après observation des femelles exposées et détermination des stades selon les critères définis dans [GEF10] et d'autre part prédite par modélisation.

Comment procéder sans information a priori sur le "statut" des stations sélectionnées comme référence - pour la définition de valeurs seuils de référence et valeurs seuils d'effet, une limite forte est la sélection des sites dits de référence sur lesquels les réponses « normales » sont calibrées. Cette sélection des sites est problématique car il est parfois difficile d'obtenir de l'information fiable et exhaustive sur les niveaux de contamination d'un site, niveaux qui peuvent évoluer au cours du temps. Par ailleurs, la contrainte d'utiliser des sites non contaminés interdit de bénéficier d'une large quantité de données et on restreint souvent le jeu de références à des situations très marginales par rapport aux stations à investiguer.

La figure 1.4 présente la médiane et la distribution de taux d'alimentation observés chez des gammars encagés sur des sites définis *a priori* comme référence ou soumis à des pressions chimiques, ceci sur la base de l'expertise de l'agence de l'eau. Ces travaux montrent que l'utilisation des données brutes ne permet pas de faire une distinction entre les sites dits de référence et les sites contaminés. Cette grande variabilité en situation non contaminée réduit fortement la puissance statistique pour discriminer les inhibitions liées à la contamination. Ce constat résulte en partie de la variabilité des températures observées sur les sites étudiés et à son influence sur cette réponses biologique [COU 11]. Comme présenté précédemment, la modélisation est une approche permettant d'intégrer l'influence de la température sur l'interprétation de la réponse observée station par station. La figure **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** 1.4B montre que cette approche a considérablement amélioré l'interprétation des données de toxicité des milieux, avec une meilleure discrimination des sites de référence et des sites contaminés. Toutefois et dans le but de définir une valeur seuil, les résultats illustrent la difficulté rencontrée avec l'utilisation de stations définies *a priori* comme référence ou contaminée. Le chevauchement des distributions observées pour les deux conditions ne permet pas simplement de définir une valeur seuil au-delà de laquelle une inhibition significative serait observée. Par conséquent, nous avons proposé une approche statistique basée sur l'ensemble des données obtenues, sans *a priori*. Cette approche statistique permet de définir un ensemble homogène de valeurs, suivant une loi normale et de le proposer comme la distribution de référence (figure 1.4C) à partir de laquelle une valeur seuil est déterminée via l'utilisation d'un percentile.

Figure 1.4 : Méthodologies pour la définition des valeurs de référence en biosurveillance. L'exemple s'appuie sur les mesures du taux d'alimentation chez *Gammarus* réalisées lors de 80 tests d'encagement in situ [COU 11] sur des stations de référence ou sur des stations sous l'influence de diverses sources de contaminations et sélectionnées par l'Agence de l'eau RMC. Le taux d'alimentation est évalué par la consommation de feuilles d'aulne sur une semaine. Figure 1.4 A- Seule une faible discrimination des deux types de stations est possible lorsque les mesures brutes sont utilisées, avec des valeurs particulièrement variables dans les stations à risque. Figure 1.4B- L'effet de confusion lié à l'influence de la température sur l'activité alimentaire est éliminé par la méthodologie présentée dans [COU 11]. C- Une définition de valeur seuil sans *a priori* sur le type de stations grâce à une délimitation statistique réalisée sur l'ensemble des valeurs - méthodologie présentée dans [BES 13].

1.2.1.4 Extrapolation et pertinence écologique des observations faites chez le gammare engagé

La pertinence des biomarqueurs en écotoxicologie notamment pour l'évaluation du risque écologique est liée à leur capacité à être des indicateurs spécifiques et écologiquement pertinents des effets toxiques de la contamination [FOR 06]. Les gammaridés sont de bons candidats pour illustrer la pertinence écologique de marqueurs moléculaires et de réponses individuelles. En effet, en se focalisant sur des espèces et des processus clés du fonctionnement écosystémique, la mise en place de tests sur une seule espèce peut permettre de mieux comprendre les effets de stress et de perturbations sur les écosystèmes. [MAL 02] ont montré par exemple que l'inhibition du taux d'alimentation chez *G. pulex* engagé était fortement corrélée à une réduction du processus de décomposition global dans les cours d'eau et une diminution des densités des communautés de macroinvertébrés. Nous présentons ici (i) comment les biomarqueurs et biotests développés chez le gammare peuvent être utilisés de façon intégrative permettant de relier ces réponses à une évaluation de la fitness individuelle, (ii) comment les développements en modélisation chez cette espèce peuvent être utilisés pour relier la modulation de biomarqueurs spécifiques à un effet populationnel, améliorant ainsi la capacité prédictive de ces outils écotoxicologiques.

1.2.1.4.1. De la réponse sub-individuelle à l'impact au niveau individuel.

Les biomarqueurs moléculaires sont des outils pertinents pour mieux comprendre les mécanismes d'effet des composés chimiques sur la fitness des organismes. Cependant, pour nombre d'entre eux, la réponse mesurée ne peut être associée à un niveau de gravité pour la fitness de l'organisme. Plusieurs études menées chez *Gammarus* se sont focalisées sur ce verrou scientifique. Par exemple, des relations quantitatives entre l'inhibition de l'activité AChE et le comportement alimentaire et la locomotion ont été établies chez *G. fossarum* [XUE 9b]. Le taux d'alimentation et la locomotion peuvent être directement corrélés aux niveaux d'inhibition de l'activité AChE. Ces travaux montrent qu'une inhibition de l'AChE au-delà de 40 % conduit à une réduction significative du taux d'alimentation et de la locomotion (Figure 1.1.2).

De même, suite à une exposition de gammares mâles à une contamination au laboratoire, une corrélation significative entre le niveau de dommages à l'ADN des spermatozoïdes mesuré par le test des Comètes et le taux d'anomalies embryonnaires chez les descendants a pu être définie [LAC 11c]. Toutefois, il apparaît que les niveaux de dommages à l'ADN mesurés dans les études de biosurveillance chez les organismes engagés dans les milieux atteignent rarement le seuil au-dessus duquel des effets sur la reproduction sont attendus [LAC11a] , [LAC 11b].

Les marqueurs physiologiques liés au métabolisme énergétique sont également des entrées pertinentes pour établir des liens entre réponses sub-individuelles et fitness [MAL 99]. Cette notion est implicite dans le concept du « scope for growth (Sfg) » comme indicateur de stress, qui fait l'hypothèse que toutes perturbations de l'utilisation des réserves énergétiques se traduisent par des modulations de la croissance et, ou de la reproduction. L'acquisition et la répartition de l'énergie déterminent les taux de développement, les taux de croissance, la fécondité et la survie, variables jouant un rôle clés dans la fitness et la structure des populations. L'indicateur Sfg a été utilisé avec succès chez *Gammarus* pour prédire les concentrations en contaminants au-dessus desquelles la croissance et la reproduction sont perturbées, ainsi que l'ampleur de cet impact. Par exemple, le coût énergétique d'une exposition de juvéniles de *G. pulex* à l'ammonium a été utilisé pour prédire l'effet de ce contaminant sur leur croissance [MAL 94b]. Il a également été montré que les réductions de Sfg observées à la suite d'un stress, sont corrélées à des réductions de reproductions, aussi bien en termes de nombre de descendants qu'en termes de viabilité des portées [MAL 90]. Des modèles à base énergétique ont été utilisés pour extrapoler et traduire les modifications de taux d'alimentation observées chez *Gammarus*, réponse la plus sensible dans les modifications du Sfg, en terme d'effets sur des variables clés de la fitness individuelle (fécondité et survie). Ces variables sont ensuite des entrées dans les modèles matriciels de dynamique de population pour prédire les taux de croissance des populations [BAI 07a].

1.2.1.4.2 Modélisation de l'impact sur la population

Les modèles de populations sont des modèles mécanistes qui relient les réponses individuelles (traits d'histoire de vie) à l'évolution de la densité et de la structure d'une population [MAL 01]. Les modèles de populations constituent une valeur ajoutée dans l'évaluation des risques écologiques, car ils permettent l'extrapolation des informations écotoxicologiques (réponses sub-individuelles et individuelles) en termes de perturbations écologiques potentielles [FOR 08]. Ces modèles sont de plus en plus utilisés pour les démarches prédictives [GAL 10] , [KRA 11], en revanche leur utilisation dans le cadre de la biosurveillance des milieux reste limitée. Différents types de modèles ont été développés chez les espèces *G. pulex* et *G. fossarum*, offrant la

possibilité de les appliquer sur des données de terrain, notamment obtenues sur organismes encagés. Des modèles structurés en classes de taille ou en stades, suivant un formalisme reposant sur des équations matricielles ou différentielles [BAI 07a] , [KUP 12] , [COU 14] , ainsi que des modèles individu-centré [GAL 10] ont été développés chez ces espèces. Tous ces modèles permettent de calculer des paramètres populationnels (e.g. taux de croissance asymptotique, densités de population), en se basant sur les traits d'histoire de vie et donc d'interpréter de façon écologiquement pertinente les marqueurs d'écotoxicité individuels.

Dans la majorité des études recourant à cette modélisation démographique en écotoxicologie, les modèles de populations sont basés sur des données de laboratoire avec des espèces peu représentatives des écosystèmes européens. Du fait du choix d'une espèce clef dans le fonctionnement des milieux aquatiques, certains modèles développés chez *Gammarus* tiennent compte de la phénologie de l'espèce et de la variabilité saisonnière sur les dynamiques des populations, contrôlées principalement par la température et la quantité de nourriture disponible [KUP 12] , [COU14]. En apportant ainsi un plus grand niveau de pertinence écologique et de complexité, le développement de modèles de populations chez *Gammarus* offre une opportunité rare d'intégrer des données obtenues directement dans les milieux étudiés pour anticiper le danger pour les populations natives. Ceci répond clairement à la nécessité d'améliorer le réalisme écologique des modèles de population pour l'évaluation des risques écologiques [FOR 08]. Des modèles matriciels périodiques pour étudier les facteurs qui contrôlent la variation temporelle dans la dynamique d'une population de *G. fossarum* au cours d'une année. Ils ont montré que la dynamique de la population est fortement sensible à la perturbation de la survie des adultes en hiver et à la fécondité au printemps et en été. Ce profil des effets sur la démographie est contrôlé par les traits d'histoire de vie de la population *Gammarus* étudiée, la modélisation offre ainsi une compréhension mécaniste des effets démographiques complexes pouvant avoir lieu dans les populations naturelles. Donc, comme illustré avec une étude de cas sur un bassin versant impacté par les activités minières, cette approche par la modélisation peut être utilisée pour anticiper les effets sur la population [COU 14]. Une approche similaire, couplant modèle d'allocation d'énergie et modèle matriciel de population structuré en classe d'âge a été utilisée par [BAI 2007a] pour prédire les changements du taux de croissance de la population résultant d'une réduction du taux d'alimentation chez des organismes exposés *in situ*. Il apparaît qu'une inhibition de 50% du taux d'alimentation est suffisante pour conduire à un taux de croissance de la population inférieure à 1 (soit le déclin de la population). Par conséquent, une inhibition de 50% du taux d'alimentation mesuré chez *Gammarus* lors des tests *in situ* devrait être associée à une réduction de la densité de la population de *Gammarus* du milieu. La capacité de prédiction des modèles a été évaluée lors d'une étude sur 9 sites soumis à des rejets contaminés [MAL 02], validant que la valeur seuil de 50% est bien prédictive d'un impact sur les populations en place [BAI 07a].

L'utilisation combinée des tests de toxicité *in situ* et de la modélisation augmente clairement la pertinence écologique de la surveillance environnementale à partir des outils écotoxicologiques [BAI 07a]. L'extrapolation entre les effets toxiques observés *in situ* et le niveau population peut aider à lever le verrou scientifique et technique qui existe entre la mesure du niveau de contamination d'un milieu et son impact sur les communautés, considérées comme étant le niveau d'intérêt à protéger. [BAI 07a] montrent les liens quantitatifs possibles entre les réponses sub-individuelles et les impacts sur la population, rejoignant le schéma proposé par l'approche AOP (Adverse Outcome Pathway) dans le cadre de l'évaluation des risques *a priori* [KRA 11]. Chez *Gammarus*, les exemples présentés ci-dessus (AChE, Comète essai sur spermatozoïdes) sont de bons candidats, car un lien avec la fitness individuelle a pu être établi. La mesure des réserves et du métabolisme énergétiques est également très pertinente pour évaluer, estimer les effets sur la performance individuelle [MAL 90] , [CHA 13]. Dans ce contexte, la mesure d'inhibition de l'alimentation est d'un fort intérêt pour une évaluation multi-échelles. Il peut en effet être relié aux altérations des traits d'histoire de vie (voir au-dessus) et a été corrélée à la modulation de biomarqueurs moléculaires spécifiques de certains modes d'actions [XUE 09b] , [COU 11]. De la même façon, les approches omiques haut débit pour le développement de biomarqueurs peuvent contribuer au développement de ce cadre multi-échelles pour le diagnostic de la qualité des milieux aquatiques, à la condition que ces développements soient réalisés en cherchant à maintenir les liens avec la physiologie et l'écophysiologie des organismes étudiés.

1.2.1.4.3. Calibration des indicateurs chez *Gammarus* à l'aide des données de bio-indication

L'évaluation de l'impact écologique lié à la contamination chimique constitue un enjeu fort pour les démarches de restauration de la qualité des écosystèmes aquatiques. D'un point de vue opérationnel, cet objectif nécessite de pouvoir établir des relations entre la présence d'une contamination biodisponible toxique et les effets sur les communautés biologiques en place. En complément des démarches d'extrapolation s'appuyant sur des outils de modélisation pour réaliser ce changement d'échelle (démarches explicitées ci-dessus), une approche

alternative pour asseoir la pertinence des réponses écotoxicologiques vis-à-vis de l'évaluation de l'impact écologique, est de confronter des mesures *in situ* de marqueurs à l'état des communautés en place ; IL'hypothèse sous-jacente étant qu'il existe une relation entre la dégradation des marqueurs écotoxicologiques et l'état des communautés. Concernant ces communautés, les informations sont disponibles sous la forme de listes faunistiques ou floristiques obtenues sur les réseaux nationaux, lors des programmes de surveillance mis en œuvre par les agences françaises de l'eau pour l'évaluation de l'état écologique imposée par la Directive Cadre Européenne sur l'Eau. Pour les réponses écotoxicologiques, comme nous venons de le voir, l'approche par encagement *in situ* offre la possibilité d'obtenir des données sur une large échelle spatiale et temporelle et de pouvoir les comparer de façon fiable les unes aux autres.

Afin d'illustrer l'approche proposée ici, nous avons mené une étude au niveau national sur plus de 100 sites des réseaux de surveillance, pour lesquels nous disposons de données de bio-indication. Sur chacun des sites, le niveau de contamination biodisponible en métaux a été obtenu en mesurant les métaux accumulés dans des gammars calibrés, engagés sur chaque site durant 7 jours.

A partir des données de bio-indications, nous avons extrait les abondances de gammars observées sur ces sites, normalisé en fonction de la typologie du cours d'eau dans lequel se trouve le site d'intérêt. Lorsque l'on confronte ces concentrations accumulées aux données d'abondances de gammars normalisée, des tendances claires de dégradation des densités de gammars se dégagent pour certains éléments comme le cadmium [CIL 17]; (figure 1.5). Des concentrations seuils dans les organismes en cage, au-dessus desquelles l'abondance de gammars est anormalement faible peuvent être déterminées. Au-delà de la seule validation de la pertinence de l'information obtenue par l'approche d'encagement pour l'évaluation de l'impact écologique, la définition de tels seuils « d'effet populationnel » à partir de cette démarche *a posteriori* offre de nombreuses perspectives pour la gestion du risque lié à la contamination chimique des milieux aquatiques. Différents travaux en cours visent à déterminer de tels seuils pour l'ensemble des indicateurs de contamination et de toxicité obtenus à partir de l'encagement de gammars.

Figure 1.5: Comparaison des niveaux de contamination biodisponible en cadmium et l'abondance des populations de gammaridés sur 97 stations des réseaux nationaux de surveillance et de contrôle opérationnel. Les niveaux de contamination sont évalués par les concentrations accumulées par des gammars mâles calibrés en taille, exposés par encagement pendant 7 jours sur site. Les abondances obtenues dans les données de suivi d'hydrobiologie par les agences de l'eau sont normalisées à partir des données du réseau de référence pour prendre en compte l'effet du contexte géographique et de la typologie du cours d'eau. Le seuil de concentration figuré représente la concentration en cadmium au-dessus de laquelle la probabilité d'observer une population en bon état est significativement réduite.

1.2.1.5 Conclusion

Ce chapitre illustre quelques démarches méthodologiques indispensables pour la découverte, la mise en œuvre et l'interprétation de biomarqueurs dans les approches de biosurveillance des milieux aquatiques. Appliquées à des invertébrés modèles, les gammars. Elles permettent de disposer de modèles biologiques pertinents pour la surveillance des milieux aquatiques. Ces modèles sont aujourd'hui largement utilisés pour évaluer le niveau de contamination et la toxicité des écosystèmes d'eaux douces.

De nombreux biomarqueurs et biotests utilisant les gammaridés sont disponibles pour des études de laboratoire, mais également de terrain, via l'expérimentation et l'encagement d'organismes. Les développements en modélisation permettant de quantifier la variabilité naturelle de ces marqueurs de toxicité au regard des facteurs abiotiques ont permis d'améliorer la robustesse et la fiabilité de l'interprétation des données acquises sur le terrain, offrant ainsi la possibilité de mettre en œuvre une surveillance à une large échelle spatiale et temporelle. Les approches omiques de nouvelle génération viennent aujourd'hui alimenter la recherche en écotoxicologie et permettent de produire de nouveaux outils, offrant en particulier la possibilité d'identifier et de quantifier de façon spécifique de nouveaux biomarqueurs chez des espèces d'intérêt environnemental, et de détecter les effets de familles de contaminants spécifiques (e.g. perturbateurs endocriniens).

L'un des développements prometteurs chez les gammaridés est l'intégration des réponses écotoxicologiques à différentes échelles d'organisation biologique, pour établir des liens avec des impacts écologiques. En effet, en couplant les tests *in situ* et les modèles de populations, il est possible de mener une évaluation écologiquement pertinente, basée sur des critères renseignant de la toxicité des milieux. Les gammaridés se caractérisent par une très large diversité phylogénétique et écologique. Leur utilisation comme espèce sentinelle pour la surveillance des milieux d'eaux douces offre l'opportunité de mieux comprendre et quantifier les sources d'incertitudes, liées à la diversité biologique (intra et inter spécifique), pour l'évaluation des risques écotoxicologiques.

1.2.2 Evaluation du risque écologique des substances chimiques du gène à la population : un exemple sur la lymnée *Lymnaea stagnalis*

1.2.2.1 Introduction

La question du changement d'échelle en écotoxicologie est étroitement liée aux objectifs majeurs de cette discipline, i.e., comprendre et prédire le devenir et les effets des substances toxiques à des niveaux d'intégration représentatifs des écosystèmes naturels et de leur fonctionnement. La complexité inhérente à ces niveaux d'intégration écologique [LOR 10] représente un défi scientifique d'importance qui motive le développement d'approches complémentaires, dont la complexité elle-même peut varier [CAQ 13]. De même, dans le domaine réglementaire, les objectifs de protection concernent les populations, communautés et écosystèmes, alors que les tests standards d'écotoxicité sont majoritairement adaptés au niveau individuel [HOM 10].

Le changement d'échelle peut être dirigé du plus simple vers le plus complexe, dans des approches de type bottom-up (de l'infra-individuel à l'organisme, puis à la population/communauté, voire à l'écosystème ; de la génération exposée aux effets à long-terme, qu'ils soient évolutifs ou épigénétiques ; d'une échelle spatiale fine à l'écorégion ; etc.). Ce type d'approche, bien que largement prépondérant depuis l'émergence de l'écotoxicologie [TRU77] n'est pas le plus approprié à la compréhension des effets écologiques à grande échelle, qui nécessite l'estimation de paramètres relatifs à ces systèmes complexes. La mise en œuvre d'approches traitant spécifiquement de la dimension écologique ces effets est plus récente en écotoxicologie. Elle fait largement appel à la théorie écologique et aux concepts associés. Elle reflète clairement le besoin critique d'améliorer la valeur écologique de l'évaluation du risque lié aux substances toxiques (pour une revue des approches top-down, voir [BEK 12]). Une stratégie alliant des allers-retours entre niveaux de complexité, par exemple entre approches de modélisation écologique et tests simplifiés en conditions expérimentales de laboratoire, semble une des solutions les plus efficaces.

Dans le contexte réglementaire, le changement d'échelle est intégré à un nouveau type d'outils. Le programme Environmental, Health and Safety (EHS) de l'OCDE soutient actuellement le développement d'un nouveau type d'outils destinés à aider les Etats Membres à faire un meilleur usage de la connaissance scientifique sur les voies de toxicité conduisant à des effets néfastes chez l'homme et/ou les espèces sauvages (voir <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/adverse-outcome-pathways-molecular-screening-and-toxicogenomics.htm>). Ces outils reposent sur le concept d'Adverse Outcome Pathway ou AOP [ANK 10]. Par construction, l'AOP relie la connaissance existante sur une série d'événements-clés connectés par des liens de causalité, entre deux points, l'événement moléculaire initiateur (interaction initiale entre une molécule et une biomolécule ou un biosystème), et l'effet néfaste qui peut s'exprimer à un niveau d'organisation pertinent pour l'évaluation du risque. Depuis sa mise en place, le site aopwiki (<https://aopwiki.org/>).archive déjà plus d'une centaine d'AOP en développement ou en cours de validation, et six d'entre eux sont d'ores et déjà adoptés par l'OCDE.

Dans ce large contexte, *Lymnaea stagnalis*, la limnée des étangs (mollusque gastéropode pulmoné d'eau douce) est un modèle de choix pour les questions d'écotoxicologie aquatique. D'origine paléarctique, cette espèce a aujourd'hui une répartition largement holarctique, qui s'étend même à l'hémisphère Sud (e.g., Nouvelle Zélande). *L. stagnalis* occupe des milieux aquatiques typiquement lenticules (stagnants), mais peut aussi coloniser des systèmes connectés comme des canaux d'irrigation, et se trouve fréquemment dans les paysages anthropisés, agricoles comme urbanisés (e.g., [BOU 14]). De par son régime alimentaire herbivore-détritivore, la limnée des étangs est représentative d'un compartiment écologique important des milieux d'eau douce. Les mollusques gastéropodes contribuent en effet à une part importante de la production secondaire de ces milieux, où ils peuvent représenter jusqu'à 60% de la biomasse macroinvertébrée [HAB 95].

Du point de vue fondamental, *L. stagnalis* est un des gastéropodes pulmonés d'eau douce les mieux étudiés, notamment en anatomie, physiologie, reproduction et endocrinologie ; voir [WIL 64], [GER 84], [SAL 16]. Depuis la révision de la taxonomie des gastéropodes [BOU 05], l'ordre des pulmonés et le sous-ordre des basommatophores ont disparu car non monophylétiques, et la position systématique actuelle de *L. stagnalis* est la suivante : Mollusca \ Gastropoda \ Heterobranchia \ Euthyneura \ Panpulmonata \ Hygrophila \ Lymnaeioidea \ Lymnaeidae. Aujourd'hui, l'espèce est un modèle dans diverses disciplines de recherche, utilisé pour traiter aussi bien de questions d'écologie évolutive, e.g., systèmes de reproduction hermaphrodite et génétique des populations [COU 11a], [COUT 13a], [ESC 11], de sélection sexuelle [NAK 14], de biologie évolutive du développement (évo-dévo, [HOH 13], [DAV 09], de neurophysiologie [FEN 09] et d'écotoxicologie (voir références de ce chapitre). Cette caractéristique pluridisciplinaire a motivé la constitution d'un consortium de séquençage pour obtenir un génome de référence chez cette espèce (STAGING, en cours de publication). Dans le domaine de la réglementation, cette espèce est actuellement l'un des rares mollusques pour lesquels existe un test standard de toxicité (OCDE, Test n°243 « *Lymnaea stagnalis* reproduction test » ; [DUC 14]). Ce test est un essai de toxicité centré sur la reproduction et la survie de *L. stagnalis*, dont une des applications possibles est celle du Cadre Conceptuel défini par l'OCDE pour les tests et l'évaluation du risque des perturbateurs endocriniens. Enfin, une souche de laboratoire est maintenue par l'INRA (souche RENILYS).

Dans leur ensemble, ces connaissances fondamentales, ressources/lignées génétiques et outils réglementaires, ainsi que les caractéristiques écologiques de *L. stagnalis* font de cette espèce un modèle parfaitement approprié à l'étude des effets des substances toxiques (notamment les pesticides) sur les invertébrés aquatiques à différents niveaux d'intégration biologique et écologique. Ce chapitre en propose une illustration, centrée sur quelques études représentatives. Le changement d'échelle sera ainsi abordé en se focalisant sur deux niveaux charnières de réponse toxicologique : l'organisme (charnière entre niveaux infra-individuels et population) et la population (charnière entre individus, populations, communautés). Du point de vue éco-évolutif, ce chapitre aborde logiquement les échelles spatiale (e.g., variabilité inter-populations) et temporelle (évolution des réponses à court ou moyen terme, effets inter- et transgénérationnels). Nous verrons également que du point de vue des méthodes, le traitement de ces questions peut faire appel à des systèmes expérimentaux de complexité croissante.

1.2.2.2 Réponses infra-individuelles

Le stress causé par les substances chimiques peut affecter l'organisme à différents niveaux, allant des mécanismes moléculaires et processus cellulaires, des voies endocriniennes et de la physiologie, des fonctions immunitaires, à l'histoire de vie et à la fitness. La réponse au stress est un processus séquentiel, qui implique l'activation de voies de signalisation puis de systèmes anti-oxydants ainsi que de mécanismes moléculaires et cellulaires généraux tels que la réparation des dommages à l'ADN et aux protéines, l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, des changements de métabolisme associés à la réparation cellulaires, ainsi que la sécrétion d'hormones de stress [KAS 09]. Chez les gastéropodes, une revue récente des réponses écophysologiques au stress peut être consultée pour plus d'information sur ce sujet [COU 16a].

En écotoxicologie, le niveau infra-individuel de réponse est typiquement abordé par des mesures de paramètres biologiques moléculaires, biochimiques et cellulaires, utilisés ou considérés comme biomarqueurs d'exposition ou d'effet.

Le stress oxydant traduit un déséquilibre entre production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et défenses anti-oxydantes. Si la production de ROS est un processus normal lié à la vie en aérobie, son augmentation peut être induite par différents facteurs. En accord avec son rôle central dans la régulation de la réponse des organismes à divers stress [KAS 09], le stress oxydant constitue du point de vue de l'évaluation du

risque, un événement-clé de plusieurs AOP (voir <https://aopwiki.org/events?uf8=%E2%9C%93&qerach=oxidative+stress>). Il est à l'origine de la toxicité de nombreux polluants [REG 02], en particulier de pesticides [VAL 06].

Ainsi, chez *L. stagnalis*, la production de ROS (dans le cas présent H₂O₂) par les hémocytes est abaissée par l'atrazine (herbicide aujourd'hui interdit en Europe mais d'usage courant ailleurs dans le monde), tandis qu'elle augmente sous l'effet d'un herbicide peroxydant, le fomesafen [RUS 04], [RUS 07a]. De plus, la transcription et/ou l'activité d'enzymes antioxydantes ont été étudiées pour leur valeur de biomarqueurs de stress oxydant, en réponse à des pesticides [BOU 13], [LAN 16], au cuivre [ATL 16], ou à des effluents de stations d'épuration et des mélanges de médicaments [GUS 13a-b].

1.2.2.2.1. Expression transcriptionnelle, activité enzymatique et processus cellulaires

Les effets du diquat (herbicide non sélectif utilisé comme agent défoliant pour le désherbage, le défanage des cultures et le faucardage des milieux aquatique) ont été étudiés chez *L. stagnalis* sur une batterie de biomarqueurs transcriptionnels et d'activités enzymatiques, mesurés en conditions expérimentales d'exposition. Il est à noter qu'en raison de ses propriétés oxydantes, le diquat (nom chimique = diquat dibromide) est une molécule modèle en toxicologie. Cette substance active a un faible potentiel de bioaccumulation, et s'adsorbe fortement aux sédiments. L'étude a montré des tendances opposées selon la concentration en herbicide (22,2, 44,4 et 222,2 µg/L), les temps d'exposition (5, 24 et 48 h; concentrations mesurées inférieures aux concentrations nominales, mais stables au cours de l'expérience) et entre deux tissus impliqués dans la réponse au stress et la détoxification. Ainsi, dans les hémocytes (cellules de l'hémolymph, tissu circulant de la limnée), la plus faible concentration de diquat induit après 24h d'exposition une surexpression de la cortactine (protéine impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine, et dans divers processus cellulaires, dont l'endocytose), de la protéine de stress hsp40, du récepteur X des rétinoïdes (RXR) et de la superoxyde dismutase à cuivre et à zinc (Cu/Zn- SOD), tandis qu'à la plus forte concentration, la transcription de la plupart des gènes étudiés est sous-régulée, en particulier après 48h d'exposition. Dans la glande digestive, les réponses sont plus précoces, avec à 5 h, une sur-expression de tous les gènes étudiés, suivie à 24 et 48 h d'un retour à des valeurs similaires aux conditions témoins. L'activité des enzymes codées par ces gènes n'est cependant pas toujours corrélée avec les niveaux de transcription observés, ce qui suggère des effets post-transcriptionnels induits par le diquat. Cependant, bien que moins intégrative que l'activité enzymatique, la transcription constitue un niveau d'expression globalement plus sensible au stress oxydant induit par le diquat chez la limnée [BOU 13]. Le couplage de biomarqueurs transcriptionnels avec des paramètres cellulaires liés à la réponse immunitaire (immunocompétence, phagocytose, teneur intracellulaire en thiols) s'avère également intéressant pour augmenter la pertinence des biomarqueurs d'effet des effluents de stations d'épuration et de mélanges de médicaments chez *L. stagnalis* [GUS 13 a-b].

La réponse cellulaire a été particulièrement étudiée dans l'hémolymph de limnées exposées à des pesticides. Ainsi, les paramètres de phagocytose, la fragilité lysosomale, et l'apoptose ont été étudiés en réponse au fomesafen, mettant en évidence un lien entre événements apoptotiques précoces et présence de phosphatidylsérine à la face externe de la membrane plasmique, ainsi qu'une baisse du potentiel transmembranaire mitochondrial suggérant l'implication de la voie intrinsèque de l'apoptose [RUS 07b], [RUS 08]. L'optimisation des conditions de prélèvement de l'hémolymph [BOI 16] doit permettre d'améliorer la qualité des données immunotoxicologiques obtenues à partir de ce tissu.

Ces exemples illustrent une démarche à l'interface entre le test de la valeur de biomarqueur et l'élucidation de mécanismes biologiques. La mise en relation des réponses toxicologiques mesurées à différents niveaux individuels (transcription, activité protéique, paramètres cellulaires) permet en effet de proposer des hypothèses sur les mécanismes impliqués, et d'orienter une recherche fondamentale plus approfondie et nécessaire au décryptage de ces mécanismes.

1.2.2.2.2. Approches gènes candidats vs omiques

Les études précitées reposent sur l'utilisation de ressources génétiques disponibles pour quelques gènes choisis pour leur pertinence *a priori* vis-à-vis des stress d'intérêt, et typiquement issues du séquençage SANGER

de cDNA complets ou d'ESTs (« *Expressed Sequence Tags* »). Durant la période précédant l'avènement des techniques de séquençage haut-débit (NGS), cette méthode était la seule utilisable. Aujourd'hui, les NGS ont permis de décupler la puissance de *screening* des approches dites « biomarqueurs ». Ce changement d'échelle (d'un gène à un transcriptome entier) offre en outre la possibilité d'aborder la question de la toxicité sans *a priori*. Chez *L. stagnalis*, de telles ressources ont été développées par RNAseq à partir du transcriptome de différents tissus, dont le système nerveux central, la glande digestive ou l'appareil reproducteur [SAD 12], [BOU 12], [COU 16b]. Ce type de ressource devient accessible chez un nombre croissant d'espèces d'intérêt en écotoxicologie, comme par exemple le gastéropode *Radix balthica* [MAZ 16].

1.2.2.2.3. Réponses à l'échelle de l'organisme

L. stagnalis a fait l'objet de nombreux travaux portant sur le niveau individuel de réponse aux toxiques. Ainsi, les performances phénotypiques de croissance, survie, reproduction sont typiquement mesurées en conditions d'exposition de laboratoire, en microcosmes ou en mésocosmes. Les objectifs de ces travaux portent à la fois sur l'acquisition de connaissances dans une démarche de test d'hypothèses, e.g., [COU 06], [COU 08a], [DUC 10a], [COU 11b], [GIU 14], [LAN 16], le développement de tests de toxicité en vue de leur application dans le cadre réglementaire [DUC 10a], [DUC14], ainsi que sur la modélisation de l'histoire de vie et de sa sensibilité au stress [DUC 10b], [ZIM 12], [BAR 14]. L'objectif n'est pas ici de présenter l'ensemble des résultats issus de ces travaux, mais plutôt d'en extraire des éléments de synthèse en relation avec le changement d'échelle.

1.2.2.2.3.1. Lien entre réponses infra-individuelles et de l'organisme

L'utilisation des biomarqueurs en écotoxicologie comme indicateurs d'alerte et précurseurs de réponses individuelles ou populationnelles fait l'objet de controverses, en raison de leur capacité limitée à prédire des effets significatifs du point de vue écologique, tant qu'ils ne sont pas associés à des modèles mécanistes permettant de les intégrer dans la mesure de performance et de *fitness* (valeur sélective d'un individu ou d'un génotype). La nature transitoire des réponses de nombreux biomarqueurs, le fait qu'ils peuvent refléter un effet délétère ou au contraire une preuve de capacité de l'individu à gérer le stress (homéostasie), l'existence d'effets confondants sur le terrain (manque de spécificité des biomarqueurs), et enfin l'approche simplement corrélative souvent mise en œuvre pour extrapoler les effets à des niveaux supérieurs, constituent autant d'arguments qui réduisent la signification écologique des biomarqueurs [FOR 06]. Chez *L. stagnalis*, de nombreux travaux ont porté sur les effets phénotypiques des polluants, sur des traits biologiques reflétant les performances individuelles de croissance, fécondité, survie, e.g., [JUM 02], [BRI 11], [COU 08a], [DUC 10b], [GIU 14], sans toutefois les relier directement à des mesures infra-individuelles de biomarqueurs.

1.2.2.2.3.2. Influence des conditions expérimentales sur les traits d'histoire de vie

L'utilisation de systèmes expérimentaux de complexité croissante a permis d'affiner la compréhension des effets écotoxicologiques du diquat chez la limnée [COU 08].

1.2.2.2.3.2.1. Toxicité du diquat seul ou en mélange avec son adjuvant

Dans cette étude, une première expérience a été réalisée dans l'objectif d'estimer les effets du diquat seul ou en mélange avec un adjuvant courant de cet herbicide, l'Agral®90 (mélange de nonylphénols polyéthoxylés). Pour cela, des lots de limnées adultes et homogènes en âge, ont été exposés à une large gamme de concentrations de chaque substance et de leurs mélanges, élaborés en respectant le ratio diquat:Agral®90 recommandé dans la formulation commerciale (voir détails in [COU 08]). Les traits mesurés étaient relatifs à la croissance adulte ainsi qu'à la reproduction et aux performances précoces de la descendance. Le mode d'interaction des deux substances (additif, synergique, antagoniste) a été testé de façon empirique, sur la base des concentrations étudiées (4 concentrations par substance, ratio constant), et en comparant les effets observés des mélanges avec ceux attendus sous l'hypothèse d'additivité. La distribution des seconds a été estimée par bootstrap (méthode statistique de rééchantillonnage avec remise) des effets observés de chaque substance aux concentrations correspondantes, et par addition de ces effets. Pour un mélange donné, tout effet observé situé dans la zone bornée par l'intervalle de confiance à 95% de la distribution attendue était considéré compatible avec le mode additif. A l'inverse, quand l'effet observé était en dehors de cet intervalle, il était considéré comme le reflet

d'une interaction synergique (effet plus fort que l'effet additif), ou antagoniste (effet plus faible que l'effet additif). Les résultats présentés dans le tableau 1 indiquent des effets additifs (en noir) ou antagonistes (en bleu), tandis qu'aucun effet synergique n'a été détecté entre le diquat et l'Agral®90. L'analyse détaillée des données montre que l'adjuvant, bien que sans effet lorsqu'il est appliqué seul, tend à réduire l'effet du diquat (croissance adulte, taux d'éclosion des pontes ; voir [COU 08]). Ces résultats préliminaires nécessitent d'être approfondis, en appliquant notamment des modèles de prédiction plus adaptés, tel que ceux basés sur le principe d'action indépendante ([FAU 03]).

Tableau 1.1. Conformité/écart à l'hypothèse d'interaction additive entre le diquat ($D : 4,4$ à $222 \mu\text{g/L}$) et l'Agral®90 ($A : 10$ à $500 \mu\text{g/L}$) sur les traits significativement affectés par les traitements (glm). Les effets sont relatifs aux valeurs des traits en conditions témoins. Les valeurs moyennes et intervalles de confiance à 95% sous l'hypothèse additive sont obtenus par bootstrap (bps): effets additifs (en noir, valeur observée située dans l'IC95% de la distribution attendue), effets antagonistes (en bleu, effet observé plus faible qu'attendu sous le modèle additif), effets synergiques (aucun).

1.2.2.3.2.2. Complexité du système expérimental et étude d'effets indirects

La seconde expérience réalisée dans cette étude avait pour objectif de mesurer l'impact de la complexité environnementale sur la toxicité du diquat. Sur la base des résultats de l'expérience précédente, les substances ont été appliquées seules et en mélange, aux deux concentrations les plus élevées ($44,4$ et $222 \mu\text{g/L}$ pour le diquat, 100 et $500 \mu\text{g/L}$ pour l'Agral®90). Pour représenter l'exposition des limnées dans un environnement s'approchant de la complexité environnementale, une exposition des limnées a été réalisée dans des microcosmes hébergeant également des plantes (élodées, lentilles d'eau) et des vertébrés (épinoches adultes) dans un volume de 100 L d'eau et sur une couche de sédiment (sédiment naturel et sable de Loire). Les traitements chimiques furent appliqués après 5 jours d'acclimatation des limnées. De manière générale, les conditions de ce test ont conduit chez les adultes exposés, à une dégradation marquée de la survie (survie moyenne de $83 \pm 3\%$, alors qu'elle était totale dans l'expérience 1) et de la fécondité (réduction d'un facteur de 10 par rapport à l'expérience 1). Les facteurs en cause sont probablement liés à des interactions intra et/ou interspécifiques, spécifiquement induites en microcosmes (compétition pour les ressources, relation prédateur/proie...). Malgré ces différences, les résultats issus des deux expériences sont cohérents : absence d'effet des traitements sur la fécondité, réduction de l'effet du diquat par l'Agral®90 aux plus fortes concentrations sur le taux d'éclosion (Tableau 2.1, dernière ligne). Une telle cohérence renforce la fiabilité des conclusions tirées en conditions simplifiées, mais n'était pas systématiquement attendue. En effet, certains effets peuvent ne se manifester que sous certaines conditions, en particulier lorsque d'autres stress affectent les organismes et leurs capacités de réponse au stress chimique (e.g., limitation des ressources énergétiques). Même si l'étude résumée n'a pas montré d'effet du diquat spécifiquement induit en microcosmes, elle illustre une démarche possible pour prendre ce type d'effet indirect en compte, et intégrer la complexité des systèmes aquatiques dans l'évaluation des effets toxiques.

1.2.2.3.2.3. Vers un modèle d'histoire de vie et de sa réponse aux polluants

Dans le cadre du développement de tests d'écotoxicité, et en vue d'application à l'évaluation du risque écologique des perturbateurs endocriniens, l'étude de [DUC 10a] a permis d'identifier au cours du cycle de vie de *L. stagnalis* une fenêtre particulière de sensibilité à la vinclozoline (fongicide choisi ici pour ses propriétés antiandrogènes). Ces travaux, ainsi que ceux portant sur les effets du diquat [DUC 10b], préfigurent le développement d'expérimentations plus approfondies ayant conduit à l'élaboration du test standard de toxicité sur le cycle de vie partiel (Test OCDE n°243 « *Lymnaea stagnalis* Reproduction Test »). Ce nouvel essai, centré sur la reproduction et la survie, permet d'inscrire *L. stagnalis* comme mollusque modèle dans le Cadre Conceptuel défini par l'OCDE pour les tests et l'évaluation du risque des perturbateurs endocriniens (voir Document Guide n°150). Parmi les modèles toxicologiques non-mammaliens, les tests préexistants concernent en effet très peu d'invertébrés. Plus précisément, ce test se situe au niveau 4 de ce cadre (test *in vivo* fournissant des données relatives à des effets pouvant être reliés au système endocrinien). Associé à des tests de niveau 2 et 3, qui informent sur les mécanismes sous-tendant les effets observés *in vivo*, ce test doit permettre de conclure sur la nature endocrinienne ou non-endocrinienne du mode d'action des molécules testées.

L'intégration des effets toxiques à l'échelle de traits individuels par application de modèles toxicocinétiques/toxicodynamiques (TKTD) a été réalisée chez la limnée dans le cadre de plusieurs thèses conduites dans le cadre de l'ITN CREAM (EU-FP7, <https://cream-itn.eu/>). Ainsi, en appliquant un modèle TKTD fondé sur la théorie du *Dynamic Energy Budget* (DEB theory ; [KOO 00]) qui permet une interprétation mécaniste des effets toxiques en termes de changement d'allocation d'énergie, Zimmer et al. [ZIM 12] ont montré que la limitation des ressources alimentaires durant les phases précoces du cycle de vie augmente la sensibilité à diverses substances toxiques. L'absence de prise en compte de ce facteur dans les tests peut donc conduire à une surestimation des effets toxiques. Par ailleurs, en modifiant ce modèle de manière à permettre des phases d'accélération métabolique au cours du cycle de vie, les auteurs ont pu décrire le cycle complet de la limnée, incluant la phase embryonnaire ainsi que l'investissement aux fonctions mâle et femelle chez cet organisme hermaphrodite [ZIM 14]. Barsi et al. [BAR 14] ont appliqué un modèle DEB simplifié (DEBkiss, [JAG 13]) et montré sa capacité à estimer la toxicité de l'acétone (solvant d'usage courant dans les tests de toxicité) sur les traits d'histoire de vie de *L. stagnalis*. Ces résultats encouragent l'application de ces modèles dans le cadre de l'évaluation du risque, qui reste encore trop limitée, en partie à cause du manque de recommandations sur le développement et l'évaluation des modèles, et sur l'utilisation des résultats qui en sont issus (mais voir [EFS 14]). La modélisation TKTD a également permis d'étudier la variation interspécifique de la sensibilité à divers pesticides parmi différents organismes modèles dont *L. stagnalis* [NYM 15]. Dans l'ensemble, ces études mettent en évidence la puissance des approches de modélisation TKTD pour une évaluation de la toxicité des pesticides à l'échelle de l'histoire de vie de la limnée. Leur combinaison à des modèles populationnels (e.g., matriciels, individu-centrés) permettra d'accroître encore leur valeur dans ce cadre [DUC 06] [MAR 12].

1.2.2.3. Réponses supra-individuelles des limnées : variation intra et inter-populations

Comme mentionné plus haut, bien que les tests de toxicité actuels portent principalement sur le niveau individuel, l'évaluation du risque écologique vise des objectifs de protection plus complexes, i.e., populations, communautés et écosystèmes. La compréhension et la prédiction des liens mécanistes entre ces différents niveaux représentent alors un enjeu majeur de l'écotoxicologie, enjeu qui s'inscrit parfaitement dans un contexte de test de théories et concepts écologiques et de biologie évolutive.

1.2.2.3.1. Impact des xénobiotiques sur la démographie et la dynamique des populations

A l'échelle des populations, les effets des polluants peuvent être indirects, via une interaction avec des processus densité-dépendants comme la compétition entre individus pour l'espace ou la nourriture (voir § X.3.2). Ces processus peuvent être exacerbés (compétition intensifiée, si tous les individus sont impactés sans mortalité) ou au contraire atténués (compétition relâchée due à la mortalité, favorisant les effets compensatoires). L'estimation de ces effets passe par celle de paramètres populationnels intégrateurs, eux-mêmes basés sur des mesures de traits individuels [FOR 01], [FOR 03], [LIE 02].

Les effets toxiques sur les populations de gastéropodes d'eau douce ont été abordés dans le cadre de diverses études, qui reposent à la fois sur des modèles de dynamique et de génétique des populations. Chez *L. stagnalis*, l'influence négative de blooms de cyanobactéries sur le taux d'accroissement des populations a été mise en évidence au laboratoire, par utilisation d'un modèle discret structuré en âge [LAN 11]. Sur la base du même type de modèle, l'étude de populations expérimentales implantées en mésocosmes extérieurs a permis de comparer les trajectoires et les risques d'extinction suite à des réductions démographiques contrôlées mimant les effets d'un stress chimique ponctuel [COU 08b].

L'impact populationnel de contaminants chimiques a été étudié chez d'autres espèces de gastéropodes d'eau douce. Par exemple, le cadmium réduit le taux d'accroissement des populations de la planorbe *Biomphalaria glabrata* [SAL 03], tandis que le musc de synthèse HHCB n'a pas d'effet sur ce paramètre chez l'hydrobie *Potamopyrgus antipodarum* [PED 09]. Ces exemples sont intéressants car ils illustrent la mise en œuvre de LTRE ("Life Table Response Experiment" [CAS 01]) chez les gastéropodes. Cette méthode permet de décomposer les effets du traitement sur le taux de croissance de la population (ici λ) en contributions issues des différences entre les paramètres qui déterminent ce taux. Ainsi, l'étude de [SAL 03] montre une différence de

sensibilité au cadmium entre deux lignées de *B. glabrata* en termes de taux d'accroissement, et selon la lignée, une contribution majeure de la survie juvénile ou du développement embryonnaire. Dans le second exemple, l'analyse montre que l'impact significatif observé sur la fécondité ne se traduit pas au niveau de la croissance de la population de *P. antipodarum* (faible sensibilité de λ à la fécondité adulte).

A partir de données mesurées sur le terrain par encagement de populations et d'un modèle structuré en taille [COUL 13] ont montré que si la survie juvénile reste le paramètre contribuant le plus à la réduction de λ chez *P. antipodarum*, la variation saisonnière des performances de reproduction et de survie adulte conditionne fortement la sensibilité de λ vis-à-vis de ces traits au cours de l'année. Ces travaux pointent la nécessité d'estimer les traits d'histoire de vie dans les conditions les plus réalistes possibles, en particulier quand ces traits sont les points finaux de mesure de tests de toxicité ou sont intégrés à un niveau supérieur d'organisation biologique. Ces travaux montrent aussi que les traits d'histoire de vie, par leur caractère intégrateur, reflètent les effets de l'ensemble des facteurs environnementaux auxquels sont exposés les organismes au cours de leur cycle de vie, i.e. l'exposome (concept d'épidémiologie humaine, élargi à la santé des écosystèmes [NCR 12]).

1.2.2.3.2. Impacts transgénérationnels et évolutifs des xénobiotiques

Les modèles purement démographiques ne permettent pas d'appréhender certains effets liés à l'exposition chronique multigénérationnelle à des substances toxiques. Il est prouvé que des processus micro-évolutifs induits par le stress environnemental peuvent se mettre en place rapidement dans les populations exposées (voir par exemple les numéros spéciaux de la revue *Ecotoxicology*) [COU 11c], [COUT 13b]. Ces processus peuvent être liés à la sélection naturelle (adaptation génétique), de nature stochastique (dérive génétique accrue par les réductions démographiques), voire résulter d'une combinaison des deux (e.g., accumulation du fardeau génétique de dérive ou de consanguinité) [BIC 00], [KLE 11], [BIJ 12]. Par ailleurs, certains effets inter- ou transgénérationnels (effets maternels, épigénétiques) peuvent être induits par les polluants [VAN 14]. Dans ce cadre, *L. stagnalis* a fait l'objet de travaux portant sur des questions d'évolution adaptative (processus sélectifs) ou neutre (i.e., due à la dérive génétique au hasard), sur l'importance des effets intergénérationnels vs génétiques dans la réponse au stress, ainsi que sur l'influence du système de reproduction sur la réponse à la sélection.

1.2.2.3.2.1. Exposition des populations au stress chimique et dérive génétique

Une première étude menée sur des populations implantées en mésocosmes extérieurs avait permis de tester empiriquement l'applicabilité de paramètres de génétique des populations à l'évaluation du risque écologique (valeur d'indicateur d'effet évolutif neutre, à court-terme). Les mésocosmes (INRA, U3E, plateforme PEARL) avaient été mis en place quatre mois plus tôt, de manière à laisser s'installer différents organismes (phyto- et zooplancton, macroinvertébrés benthiques et macrophytes). Les populations de *L. stagnalis* ont ensuite été fondées à partir d'adultes élevés depuis la naissance au laboratoire et issus de 80 familles maternelles distinctes (population naturelle dont est issue l'actuelle souche RENILYS). En jouant sur le nombre d'individus fondateurs (80 vs 8) et leur degré d'apparentement (non apparentés vs fratries), quatre effectifs efficaces initiaux ont été définis, i.e., $N_e = 80, 53, 8, 5$ ($N_e =$ nombre d'individus d'une population idéale pour lequel le degré de dérive génétique serait équivalent à celui de la population réelle) et chaque type de population répliqué quatre fois (n total = 16 populations, figure 2.6).

Figure 1.6. Plan expérimental utilisé pour tester les effets de la dérive génétique chez *L. stagnalis*

Après quelques générations, la structure génétique des populations a été comparée entre les différentes catégories, sur la base des marqueurs microsatellites disponibles [KNO 03]. Les résultats obtenus étaient compatibles avec les attendus théoriques relatifs à la dérive génétique, i.e., baisse de diversité génétique et différenciation accrue des populations de taille initiale plus faible [COU 08b].

Dans une seconde étude, des populations de *L. stagnalis* avaient été fondées en mésocosmes à partir d'un même pool génétique et du même niveau de diversité (40 familles représentées de façon équitable et similaire). Après 4 mois, les populations avaient été soumises pendant trois générations à une succession de cocktails pesticides reflétant la contamination due au traitement de parcelles selon différents programmes de protection des cultures. L'objectif général était de comparer l'impact de traitements conventionnels et alternatifs (substances moins nombreuses et moins concentrées) sur les écosystèmes aquatiques [AUB 11]. L'étude a notamment montré une réduction significative d'abondance des limnées dans les mésocosmes traités, l'impact le plus sévère étant induit par les traitements conventionnels. Par ailleurs, l'étude génétique focalisée sur *L. stagnalis* a montré une réduction significative de la diversité génétique neutre et une différenciation accrue des populations soumises aux traitements conventionnels, i.e., les plus impactées du point de vue démographique [BES 13], [COUT 13b]. Ces résultats, conformes aux effets théoriques de la dérive génétique, montrent entre autre que les polluants peuvent avoir un impact génétique significatif à très court terme.

Cependant, si les résultats semblent prometteurs quant à l'utilisation de ces marqueurs génétiques pour l'écotoxicologie des populations, il faut rappeler que dans les deux cas, les populations étaient issues de pools génétiques contrôlés, afin de capturer les changements génétiques récents. Ces conditions ne reflètent en aucun cas la complexité du terrain et encore moins l'histoire évolutive des populations naturelles. L'interprétation des patrons génétiques observés *in natura* reste délicate, et n'offre pas en soi la démonstration de causalité entre contamination des milieux et état génétique des populations. Elle doit être corroborée par d'autres types de marqueurs ou d'information [BIC 11]. De nouveaux marqueurs récemment développés par séquençage chez *L. stagnalis* (SNPs ; MA Coutellec, résultats non publiés) doivent permettre d'aborder ces questions avec une meilleure résolution.

Les mutations délétères spontanées existent de façon quasi universelle et constituent le fardeau génétique [LYN 98]. Bien que contre-sélectionnées, certaines d'entre elles ont en raison de leur faible effet, une probabilité non-nulle de fixation, qui augmente dans les petites populations (fardeau génétique de dérive) [WHI 00]. Dans les milieux exposés à des contaminations multiples et répétées (e.g., paysages agricoles), l'impact démographique est un facteur qui augmente ce risque d'accumulation. Un moyen empirique de tester l'existence de ce fardeau de dérive repose sur la mise en évidence d'hétérosis entre populations. Le principe est simple. Parce qu'elle relève d'un processus non directionnel, l'accumulation du fardeau génétique de dérive entraîne une divergence des populations aux gènes concernés (différentes petites populations ne fixeront pas les mêmes allèles délétères). Lorsque l'on croise des individus de différentes petites populations, la fitness de la descendance produite est alors censée surpasser celle des descendants issus des croisements intra-populations correspondants (hétérosis). Nous avons testé cette hypothèse sur les populations expérimentales de *L. stagnalis* et en suivant le protocole résumé dans la figure 2.6. L'étude a montré un hétérosis significatif entre les populations de plus petit effectif [COU 11a]. Ces résultats montrent qu'en milieu lentique et pour des organismes à faible capacité de dispersion, des processus évolutifs associés à la dérive génétique (et néfastes pour la diversité génétique) peuvent se produire à l'échelle de quelques générations. Par extension, les polluants ayant un impact démographique négatif peuvent renforcer ces processus.

1.2.2.3.2.2. Effets sélectifs des pesticides

Comparativement à la dérive génétique, l'adaptation génétique revêt un caractère positif intrinsèque, mais peut avoir des conséquences négatives indirectes, notamment quand la population n'est plus soumise à l'agent de sélection mais doit affronter d'autres changements environnementaux (perte de potentiel adaptatif) [BLO 05]. Cependant, les conditions nécessaires pour qu'une adaptation puisse évoluer dans une population sont plus restrictives que celles induisant de la dérive. De plus, l'étude des réponses adaptatives doit tenir compte de caractéristiques génétiques telles que celles liées au mode de reproduction. Chez *L. stagnalis*, hermaphrodite simultané, cette question a été abordée d'une part en conditions expérimentales, et d'autre part en conditions naturelles.

Dans le premier cas, l'objectif était d'estimer l'influence de l'autofécondation sur la capacité de réponse à la sélection par l'herbicide diquat. La question fondamentale sous-jacente est qu'en théorie, la réponse à la sélection peut être facilitée par l'autofécondation, en raison d'une transmission de complexes de gènes co-adaptés plus efficace que par reproduction croisée. Alternativement, la dépression de consanguinité (réduction de la valeur sélective en autofécondation, due à l'homozygotie et à la perte de variabilité génétique) peut réduire la réponse à la sélection. Pour tester ces hypothèses, des lignées issues d'une population artificielle ont été créées au laboratoire, et soumises pendant trois générations à la sélection par le diquat sur la survie précoce (n = 8 lignées) ou à des conditions témoins (n = 8 lignées). Ce traitement était croisé avec le facteur reproduction, soit pour chaque modalité, 4 lignées maintenues par fécondation croisée et 4 lignées par autofécondation (figure 2.7).

A l'issue de la période de traitement, les performances des 16 lignées ont été mesurées pour divers traits d'histoire de vie et utilisées pour estimer la dépression de consanguinité en conditions de sélection et en conditions témoins. Pour chaque lignée et chaque trait, le ratio des valeurs mesurées en autofécondation sur celles mesurées en fécondation croisée est calculé et confronté à la ligne d'égale fitness (performances identiques des deux modes de reproduction, en pointillé bleu sur les graphiques, figure. 2.6). L'analyse montre que la dépression de consanguinité demeure plus forte en conditions de sélection, et que donc l'autofécondation aggrave l'effet à long-terme du diquat chez cette espèce (Fig. 2.7) [DUV 16]. Ce résultat est cohérent avec l'hypothèse que le stress augmente la dépression de consanguinité, hypothèse empiriquement soutenue par de nombreux travaux [FOX 10].

Figure 1.7. Résumé du plan expérimental utilisé pour étudier l'effet de l'autofécondation sur la réponse de *L. stagnalis* à la sélection. Comparaison de la dépression de consanguinité « témoin » et de celle estimée en conditions de sélection par une substance chimique modèle (diquat).

Dans le second cas, l'étude des patrons de divergence génétique des populations a été réalisée sur la base de 14 populations naturelles de *L. stagnalis* échantillonnées dans des sites contrastés (zones agricoles et urbaines vs zones dites de référence). L'objectif était de tester l'hypothèse d'adaptation locale aux pressions de sélection induites par les activités humaines, en appliquant une méthode classique de biologie évolutive, basée sur la mesure au laboratoire de traits d'histoire de vie liés à la valeur sélective, sur des lignées issues d'individus prélevés en milieu naturel. Cette méthode compare la divergence génétique des populations aux traits mesurés (indice QST) à la divergence génétique neutre de ces mêmes populations estimée à partir de marqueurs génétiques neutres (indice FST) ; voir [LEI 1]. La comparaison statistique des deux indices permet de distinguer trois catégories de patrons de divergence des populations: sélection divergente (adaptation locale, $QST > FST$), dérive génétique ($QST = FST$), sélection uniforme ($QST < FST$). L'étude illustrée ici a montré un effet d'adaptation locale (sélection divergente) pour les traits adultes, tandis que les traits de vie exprimés plus précocement tendent à être influencés par la dérive au hasard, voire être sous sélection uniforme [BOU 14].

Ce design expérimental a également été appliqué à des mesures de variation génétique de l'expression transcriptomique constitutive ou induite par le diquat. Les résultats de cette étude montrent une variation de la transcription largement dominée par l'origine génétique des lignées. L'expression globale à ce niveau, qu'elle soit constitutive ou induite par l'exposition expérimentale au pesticide modèle, reflète en effet une divergence génétique très forte des populations, selon un schéma parfaitement cohérent avec la différenciation neutre (figure 2.8). Cette correspondance suggère que la dérive génétique est une composante majeure de l'évolution de l'expression génique chez l'espèce étudiée. Ce résultat préliminaire ouvre des perspectives intéressantes sur les facteurs d'évolution à court-terme des processus moléculaires de réponse au stress environnemental [COU 14].

Figure 1.8. Projection de 16 échantillons de *L. stagnalis* sur le plan principal de l'ACP des données d'expression de 45249 contigs (RNAseq, données normalisées). Symboles = traitement chimique (tre), couleur = population d'origine (pop). Surimposés sur le graphique: (A) localisation géographique des populations d'origine, (B) arbre des distances génétiques neutres inter-populations (Arbre Neighbour-Joining basé sur les valeurs de F_{ST} issues de 12 loci microsatellites).

Cette approche a été utilisée pour étudier la divergence génétique de la tolérance des populations de *L. stagnalis* à un autre pesticide courant, le sulfate de cuivre. L'idée était ici de *montrer que des modèles et indices de génétique des populations peuvent servir à étayer des principes d'évaluation du risque écologique*. En particulier, dans le contexte actuel des tests standards, où les effets mesurés sur une lignée de laboratoire sont extrapolés au niveau de l'espèce, nous proposons l'idée que seul un mode de sélection uniforme ($QST < FST$) peut autoriser une telle extrapolation. Dans cette étude, nous avons mesuré la toxicité aiguë de $CuSO_4$ chez 8 lignées issues de 8 populations différentes et génétiquement différenciées. Pour cela, les lignées ont été soumises à la LC_{50-48h} estimée au préalable sur un pool d'individus représentatifs de l'ensemble des lignées étudiées (figure 2.9).

Figure 1.9. Etude de la variation de sensibilité de *L. stagnalis* au cuivre : protocole résumé.

Tableau 1.2. Variation génétique de la sensibilité de *L. stagnalis* au cuivre : mortalité moyenne par population après 96h d'exposition à $65 \mu g/L$ $CuSO_4$, et groupes statistiquement homogènes (glm et test post-hoc).

Tableau 1.3. Analyse de la variation de sensibilité à $CuSO_4$ chez *L. stagnalis*. Modèles linéaires généralisés à effets mixtes (M1 à M5) sont comparés par un test de rapport de vraisemblance (P-value). AIC = critère d'information d'Akaike (valeur la plus faible en gras, indiquant le meilleur modèle).

Entre populations, la mortalité peut varier d'un facteur de 5 (tableau X.2). L'analyse statistique montre une variation très significative entre populations, et dans une moindre mesure entre familles au sein des populations, ceci indépendamment de la taille du corps (tableau X.3). En accord avec cette variation, l'analyse $QST-FST$ indique une divergence significative des populations, attribuable à la dérive génétique, et exclut donc la sélection uniforme. Vis-à-vis de l'hypothèse de départ, ce résultat tend donc à invalider les procédures actuelles d'évaluation (qui reposent implicitement sur un modèle de sélection uniforme), et milite pour la prise en compte de la variation génétique dans le cadre réglementaire [COT 15]. La méthode utilisée dans l'étude illustrée ici peut être appliquée à cette fin.

1.2.2.3.2.3. Effets inter-générationnels non génétiques

L'influence de l'exposition parentale à des pesticides sur la réponse de la descendance à d'autres facteurs de stress environnemental a été testée en associant des expositions en mésocosmes extérieurs (parents) et des conditions de laboratoire (descendants). Cet exemple reprend l'étude présentée au paragraphe 2.2.2.3.2.2. sur les effets comparés des traitements pesticides conventionnels et alternatifs.

Figure 1.10. Plan résumé de l'étude testant l'influence de l'exposition parentale aux pesticides et de l'origine génétique des limnées sur la réponse à un stress environnemental calibré [COU 11].

Recapturés après 6 mois d'exposition à divers mélanges de pesticides en mésocosmes extérieurs, les individus fondateurs survivants ont été ramenés au laboratoire, et leurs performances de croissance et de reproduction estimées en isolement (figure 2.10). Le marquage physique de ces limnées au moment de la fondation des populations (marques pour abeilles, collées sur la coquille) a permis d'identifier leur origine familiale lors de la recapture. Au laboratoire, la descendance issue de ces adultes recapturés a été exposée à un gradient de stress biotique (4 niveaux). L'analyse de la croissance individuelle a montré un clair effet du stress biotique le long du gradient utilisé, mais pas d'influence de l'exposition parentale aux pesticides sur la réponse à ce stress biotique (pas d'effet maternel lié aux pesticides). Enfin, l'étude a montré à chaque génération une interaction significative famille \times condition, reflétant des interactions de type Génotype \times Environnement, importantes en termes de potentiel d'évolution adaptative face aux pressions testées [COU 11b].

La contribution relative des effets parentaux et des effets de l'exposition précoce a également été étudiée chez l'escargot d'eau douce *Physa pomilia* exposé au cadmium [PLA 13]. D'après cette étude, la tolérance des juvéniles au cadmium est accrue à la fois par l'exposition parentale et par l'exposition directe des embryons. De plus, l'étude montre un rôle prédominant de la plasticité développementale (exposition directe) dans ce

processus, comparativement à celui de la transmission maternelle. Le mécanisme moléculaire responsable de cette tolérance induite reste cependant à élucider.

1.2.2.3.3. Perspectives

Dans ce chapitre. Les exemples choisis ont mis en évidence l'importance des connaissances et des ressources acquises au cours de cette décennie chez *L. stagnalis* et la valeur de cette espèce en tant que modèle pour l'écotoxicologie et l'évaluation du risque écologique posé par les polluants chimiques. Les ressources acquises, qu'elles soient de nature génétique (transcriptome, génome de référence, marqueurs génétiques neutres, lignées génétiques sélectionnées, souche RENILYS), issues de la modélisation (modèles DEB), ou développées pour la réglementation (ligne directrice OCDE), sont indispensables au développement de futurs travaux de recherche visant à comprendre et prédire les effets écotoxicologiques des polluants chez *L. stagnalis*.

1.2.2.3.3.1. Vers une stratégie graduelle de tests de toxicité chez la limnée

Dans l'optique d'une évaluation de risque écologiquement pertinente, le génome séquencé et annoté de *L. stagnalis* permettra de mettre au point de nouveaux marqueurs d'expression génique. Ainsi, les annotations de gènes prédits dans la superfamille des récepteurs nucléaires serviront à développer des tests de criblage *in vitro* à visée mécaniste, relatifs à la perturbation endocrinienne et à la régulation des gènes cibles de ces récepteurs. Les systèmes endocriniens sont mal connus chez les invertébrés (en particulier les mollusques), et l'usage actuel de tests basés sur les modèles vertébrés peut conduire à des interprétations erronées. Il est donc urgent de pouvoir disposer d'outils propres aux espèces « modèles » du point de vue écologique et environnemental, telles que la limnée. Pour une évaluation complète (voir document guide n°150 de l'OCDE pour les Tests et l'Évaluation du risque des Perturbateurs Endocriniens), les résultats de ces criblages pourront être confrontés aux résultats des tests *in vivo* mesurant les effets adverses, tel que le Test OCDE n° 243. L'intégration de modèles prédictifs à l'échelle des populations permettra à terme de compléter cette approche graduelle (« tiered approach ») de test de toxicité spécifiquement dessinée pour le modèle limnée.

Chez *L. stagnalis*, le développement d'AOP (voir introduction) représente une autre perspective très stimulante pour aller plus loin dans l'intégration des réponses toxicologiques à des niveaux d'organisation pertinents pour l'évaluation du risque. Les outils de modélisation disponibles seront utiles pour mener cette démarche jusqu'au niveau populationnel. A notre connaissance, aucun AOP n'est encore publié chez *L. stagnalis*, mais une analyse récente des voies de toxicité du nickel montre que l'approche est prometteuse [BRI 17]. Dans le même ordre d'idée, l'ensemble des données actuellement disponibles sur les effets du diquat chez *L. stagnalis* (depuis le transcriptome jusqu'au cycle de vie complet) doit permettre de développer un AOP pour cet herbicide chez un organisme non-cible. Il est à noter que les réponses transcriptomiques de *L. stagnalis* au diquat sont d'ores et déjà incluses dans une base comparative (Comparative Toxicogenomics Database ; <http://etdbase.org/>). Ces informations pourraient être enrichies par un niveau d'observation métabolomique, comme récemment appliquée au cas de la toxicologie de l'imidacloprid sur le SNC de *L. stagnalis* [TUF 15]. En outre, l'étude plus fine de l'expression génique est possible par hybridation *in situ*, comme par exemple selon la méthode optimisée pour embryons entiers, récemment publiée chez la limnée [HOH 15].

1.2.2.3.3.2. La limnée, hermaphrodite modèle pour l'écotoxicologie

Les travaux présentés dans le présent chapitre montrent que la réponse phénotypique de la limnée aux polluants chimiques peut être influencée par le mode de reproduction. Chez cet organisme, l'hermaphroditisme simultané rend l'auto- et l'allofécondation possibles pour un même individu. Si la fécondation croisée reste le mode préférentiel chez *L. stagnalis*, l'autofécondation a lieu quand les chances de rencontre d'un partenaire deviennent trop faibles [ESC 11]. Par ailleurs, la fécondation croisée peut impliquer un coût spécifique (énergie allouée à la recherche de partenaire et à la copulation, exposition aux prédateurs, aux pathogènes et parasites), qui peut rendre l'autofécondation plus avantageuse sous certaines conditions. Parmi celles-ci, le stress chimique et l'activation des mécanismes de réponse nécessaires à la gestion de ce stress peuvent jouer un rôle non négligeable [COU 06]. En conséquence, il semble judicieux d'inclure le système de reproduction dans les tests de toxicité, en particulier dans le cadre de la perturbation endocrinienne. Il est à noter que le test OCDE n°243 ne

tient pas compte de ce paramètre. Sachant que l'hermaphroditisme est présent dans de nombreux phyla invertébrés, dont les cnidaires, mollusques, annélides, plathelminthes, nématodes, ou encore les urochordés [AUL 06], le développement de tests appropriés à la reprotoxicité chez ce type d'organismes est aujourd'hui incontournable. Les études expérimentales citées dans ce chapitre montrent que l'approche est tout à fait envisageable chez *L. stagnalis*, et font de cette espèce un bon modèle pour l'évaluation du risque chez les animaux hermaphrodites.

1.2.2.2.3.3.3. La limnée, espèce modèle pour l'écotoxicologie évolutive

Harmoniser la portée des outils d'évaluation du risque et les objectifs de protection visés par la réglementation est un objectif majeur des recherches actuelles en écotoxicologie. Une donnée particulièrement intéressante dans ce cadre est le polymorphisme de séquence, qu'il soit localisé dans les régions promotrices des gènes, les transcrits eux-mêmes ou les régions non codantes du génome. En effet, ce polymorphisme génétique est à la base des processus adaptatifs dans les populations et son étude doit en toute logique être intégrée aux procédures d'évaluation de risque à long-terme. A cet égard, l'accès aux données omiques permis par les nouvelles technologies et les nouveaux modèles de génomique des populations ont un énorme potentiel, et leur mise en oeuvre doit permettre d'avancer significativement dans cette voie [OZI 17]. Les travaux présentés dans ce chapitre offrent des pistes pour prendre en compte la variabilité génétique dans les tests expérimentaux, mais d'autres approches, notamment de recherche de signal de sélection dans les génomes en populations naturelles, peuvent être explorées en parallèle chez la limnée, et ceci grâce au génome de référence nouvellement acquis.

1.2.2.2.3.3.4. La limnée, espèce modèle pour l'écotoxicologie des communautés

Pour clore ce chapitre, il faut mentionner que le niveau communauté n'a pas été abordé car il aurait nécessité un développement spécifique trop important. Cependant, les outils expérimentaux adaptés à ce niveau d'organisation existent et sont déjà été largement mis en oeuvre dans ce contexte (plateformes PEARL et PLANAQUA, AnaEE-France) [MOU 15], comme le montrent par exemple de récents travaux portant sur l'impact d'un pesticide sur la niche trophique de deux gastéropodes d'eau douce, dont *L. stagnalis* [BAY 14].

1.2.3. Etat de santé des poissons en rivière

1.2.3.1 Introduction

L'évaluation de l'état écologique des masses d'eau, tel qu'il est défini par la Directive Cadre sur l'Eau 2000/60/CE, s'appuie sur différents indicateurs incluant notamment l'évaluation de la qualité des peuplements piscicoles. Du fait de son positionnement à des niveaux élevés des chaînes trophiques et de sa large répartition dans les cours d'eau, le poisson est un modèle d'intérêt pour évaluer la qualité des milieux aquatiques. Il présente en effet une importante capacité d'intégration de l'ensemble des facteurs caractérisant la qualité des milieux (habitats, physico-chimie, hydrodynamique).

Les méthodes de bio-indication utilisées à des fins réglementaires permettent de recueillir une information précieuse sur l'état des peuplements piscicoles. Elles ne permettent toutefois pas de renseigner sur les causes physiologiques et environnementales des perturbations pouvant affecter les populations ; une information pourtant nécessaire à la reconquête de la qualité des milieux aquatiques.

La mesure de réponses individuelles ou sub-individuelles plus couramment appelées biomarqueurs peut apporter des éléments sur l'état de santé des organismes pouvant être reliés à l'état de santé des populations. Toutefois, pour atteindre cet objectif, il est nécessaire de mettre en oeuvre une méthodologie adaptée tant en termes d'espèces prélevées dans le milieu naturel que de biomarqueurs mesurés ou encore de protocole d'échantillonnage.

Afin de mettre en lumière le potentiel des biomarqueurs dans un contexte de surveillance réglementaire des masses d'eau mais aussi les limites opérationnelles de ces outils, le présent chapitre s'appuie sur différentes études de cas. Une première étude porte sur le déploiement d'un ensemble de biomarqueurs, mesuré chez différentes espèces de poissons, sur un réseau de surveillance développé sur un bassin hydrographique. Les études suivantes, plus localisées, consistent en des enquêtes environnementales réalisées dans le but de comprendre et expliquer des atteintes observables au niveau individuel voire opérationnel.

1.2.3.2 Déploiement des biomarqueurs au sein d'un réseau de surveillance

La surveillance de l'état des masses d'eau telle que décrite par la DCE s'appuie sur différents réseaux de surveillance mis en œuvre à l'échelle des bassins hydrographiques. Ces réseaux se caractérisent par un nombre important de sites de prélèvements présentant des caractéristiques variées en termes de peuplement piscicole ou encore de propriétés hydrologiques et hydro-morphologiques. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés aux 31 sites du réseau de contrôle de surveillance du bassin Artois-Picardie.

1.2.3.2.1 Conditions de déploiement des biomarqueurs à l'échelle d'un bassin hydrographique

Trois espèces de poissons ont été échantillonnées à raison de 20 individus par site : le gardon, l'épinoche et le chabot. Pour des raisons pratiques mais aussi afin de diminuer les coûts d'échantillonnage, les prélèvements de poissons nécessaires à la mesure des biomarqueurs ont été couplés au suivi des peuplements piscicoles réalisés par l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques aujourd'hui Agence Française pour la Biodiversité (AFB). Parmi les 31 sites investigués, 6 n'ont pas permis de prélever de poissons pour les analyses envisagées du fait d'un effectif insuffisant ou de l'absence des espèces sélectionnées (Tableau 2.4).

Tableau 1.4 : *Présence des différentes espèces sélectionnées (20 individus) pour la mise en œuvre d'une approche multi-biomarqueurs sur le bassin Artois-Picardie sur 31 stations du réseau de contrôle de surveillance.*

Sur chaque individu, un ensemble de biomarqueurs incluant des enzymes de biotransformation, des marqueurs du stress oxydant, des paramètres de neurotoxicité et de perturbation endocrinienne est mesuré (Tableau 2.5). En complément de ces marqueurs biochimiques, des analyses histologiques du tissu gonadique ont été réalisées afin de rechercher des phénomènes d'intersexe mais également des fibroses et des nécroses.

Tableau 1.5 : *Présentation des biomarqueurs utilisés dans le cadre du Réseau de Contrôle de Surveillance (RCS) Artois-Picardie.*

1.2.3.2.1.1 Une information sur la qualité des milieux aquatiques en Artois-Picardie

Le déploiement d'une approche multi-biomarqueurs dans le cadre du Réseau de Contrôle de Surveillance Artois-Picardie permet de compléter, pour les sites étudiés, les informations relatives à la qualité du milieu (i.e. données chimiques et biocénotiques). C'est notamment le cas pour ce qui est de l'exposition des poissons à des composés perturbateurs endocriniens. Les résultats acquis montrent en effet :

- Des concentrations de VTG circulante supérieures à 1 µg/mL chez les gardons provenant de 4 sites (i.e. l'Hogneau HOG, l'Helpe Mineure HEG, la Scarpe canalisée SCN et le Cligneux CLI ; Fig 2.11). Ces résultats reflètent très certainement l'exposition des poissons à des molécules présentant une activité œstrogénique : une hypothèse qui, exceptée pour le Cligneux, est en accord avec les résultats d'activités œstrogéniques mesurées dans les sédiments.

Figure 1.11 : *Concentrations en vitellogénine circulante mesurées chez des gardons mâles provenant des sites du RCS Artois-Picardie. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± IC₉₅.*

En effet, des activités de 1,1, 1,3 et 5,4 ng E2eq/g sont détectées sur les sites de l'Hogneau, de l'Helpe Mineure et de la Scarpe canalisée. Si les molécules impliquées restent à identifier, de nombreux travaux documentent la présence de xéno-œstrogènes tels que des œstrogènes naturels et de synthèse, des alkylphénols, des parabènes ou certains pesticides, dans les milieux aquatiques continentaux [KIN 10]. Sur certains sites, ces résultats sont à mettre en regard de résultats obtenus à des niveaux d'organisation biologique supérieurs. C'est le cas pour l'Hogneau et le Cligneux sur lesquels les gardons présentent également de l'intersexualité (i.e. 33% et 17% de gardons intersexués respectivement). De même, les poissons mâles provenant du Cligneux se caractérisent par un Indice Gonado-Somatique similaire à celui qui est mesuré chez les femelles. Ces différents résultats confirment la contamination des sites étudiés par des molécules ayant une activité de type perturbateur endocrinien et concourent à mieux cerner la sévérité des effets œstrogéniques mis en évidence dans certains cours d'eau.

- Sur le site de la Rhonelle, les épinoches échantillonnées hors de leur période de reproduction, présentent une concentration rénale de spiggin de 2137 U/mg de rein. Ce résultat indique clairement une exposition des organismes à des molécules ayant une activité androgénique. Cette valeur est en effet à mettre en regard des concentrations non détectables observées sur des sites non anthropisés à la même période [SAN 08c]. Cette conclusion est étayée par des travaux antérieurs [KIN 10] qui mettent en évidence une activité androgénique dans les sédiments (3,6 ng DHT eq/g séd.). Les contaminants à l'origine de cet effet restent à identifier. Il pourrait toutefois être supposé que les activités agricoles et notamment d'élevage présentes sur le bassin de la Rhonelle contribuent à la contamination du milieu par des molécules androgéniques comme suggéré par les résultats d'une étude menée sur un cours d'eau américain recevant les effluents de structure d'élevage bovin [SOT 04].

Des données sont également acquises sur des sites de référence définis dans le cadre de la mise en œuvre de la DCE. Les résultats obtenus chez le chabot montrent que sur plusieurs des sites investigués, les poissons sont exposés à différentes familles de polluants interférant avec les fonctions physiologiques des organismes. Il est en effet notable que les poissons provenant de la Selle présentent une induction significative des activités de biotransformation (i.e. EROD, GST) au même titre que les poissons de la Lys, la Lawe et l'Aa (figure 2.12).

Figure 1.12 : Profil de réponse des activités de biotransformation EROD et GST chez les chabots échantillonnés sur les sites du RCS Artois-Picardie. Les sites HEM, CRE, HAN, HEL, SEL, EVO et NOY sont des sites de référence. Les données sont présentées sous la forme moyenne \pm SD.

Ces résultats pourraient s'expliquer par la présence, dans les sédiments, de molécules de type HAP ou dioxine tel que mise en évidence par la mesure d'activité biologique dans ce compartiment. L'effet de ces molécules sur les activités de biotransformation EROD et GST est en effet largement documenté [WHY 00], [VAN 03]. De même, les activités AChE mesurées chez les chabots provenant des sites de référence, comprises entre 26 ± 13 et 75 ± 41 U/mg prot, sont plus faibles que sur les sites contaminés (figure 2.13). Elles sont également plus faibles que celles mesurées chez des chabots témoins issus d'expérimentation en conditions contrôlées (AChE moyenne = 118 ± 35 U/mg prot) ou d'autres sites peu anthropisés situés, par exemple, sur le bassin de la Vesle (132 ± 44 U/mg prot ; Jolly et al. 2012).

Figure 1.13 : Profil de réponse de l'activité AChE les chabots échantillonnés sur les sites du RCS Artois-Picardie. Les sites HEM, CRE, HAN, HEL, SEL, EVO et NOY sont des sites de référence. Les données sont présentées sous la forme moyenne \pm SD.

Si différents facteurs environnementaux sont connus pour affecter l'activité de l'AChE comme la température, les différences observées entre les sites ne semblent pas suffisantes pour expliquer à elles seules les variations de l'AChE. La présence dans le milieu de molécules ayant une activité neurotoxique ne pourrait expliquer que partiellement ce résultat. Cette hypothèse, trouve sa cohérence dans les résultats d'études menées récemment sur les sites de référence français et montrant que l'utilisation d'un critère relatif à l'occupation des sols déclasserait les 7 sites de référence du bassin Artois-Picardie notamment en raison des pressions agricoles [CHA 10]. En effet, des nombreuses molécules utilisées comme pesticides dans les pratiques agricoles sont connues pour leur capacité neurotoxique [PAV 92], [PAY 96].

1.2.3.2.1.2 Avantages et limites des biomarqueurs dans les réseaux de surveillance

Cette étude, réalisée sur le Réseau de Contrôle de Surveillance du bassin Artois-Picardie, a permis de dégager des conclusions opérationnelles quant à l'utilisation des biomarqueurs dans le cadre de réseaux de surveillance à grande échelle, en terme de :

- Faisabilité. En effet, ce travail a permis de montrer qu'il était possible de mettre en œuvre une approche multi-biomarqueurs chez le poisson dans le cadre d'un réseau de surveillance tant du point de vue de l'échantillonnage que de l'analyse des échantillons.
- Complémentarité. Les résultats obtenus avec les biomarqueurs sélectionnés mettent en évidence des effets explicables par des familles de molécules qui ne sont pas ou peu suivies dans le cadre de la surveillance chimique des masses d'eau. C'est par exemple le cas des œstrogènes et des androgènes.

Ce travail a également permis de mettre en lumière différentes difficultés inhérentes au déploiement à large échelle des biomarqueurs avec :

- La sélection des espèces sentinelles. Les trois espèces choisies ont permis l'échantillonnage sur 25 des 31 sites du RCS. De plus, 12 sites ont permis la capture de chabot, une espèce largement distribuée sur ce bassin mais dont le potentiel en écotoxicologie était inconnu au début de l'étude. Il est alors prévisible que le nombre d'espèces à utiliser augmentera avec la taille des réseaux et que le recours à des espèces peu ou pas documentées sera nécessaire sauf au risque de ne pouvoir acquérir de données sur l'ensemble des réseaux.
- L'identification d'un réseau de référence. La configuration des réseaux de surveillance rend la comparaison amont/aval impossible exception faite de quelques rares cas. Le recours au réseau de référence apparaît alors comme une alternative séduisante. Toutefois, le réseau de référence peut ne pas permettre l'échantillonnage de toutes les espèces comme ce fut le cas dans cette étude. De plus, les critères qui ont permis la mise en place de ce réseau n'intègrent pas la pression par les micro-polluants et des réponses biomarqueurs, parfois importantes, peuvent être mesurées sur ces sites.

1.2.3.3. Retour d'expérience sur l'utilisation des biomarqueurs dans un contexte d'investigation terrain ?

1.2.3.3.1 Parasitisme et hémorragies dans un petit cours d'eau

En 2008, des observations réalisées par la fédération de pêche du Nord mettaient en évidence dans l'Escrière, petite rivière soumise à une pression agricole et à des rejets urbains, des épinoches fortement parasitées présentant de nombreuses hémorragies et entraînant une mortalité accrue des poissons. Face à ce constat, une étude a été réalisée afin de mettre en évidence une éventuelle cause toxicologique à ces perturbations [SAN 10]. Des épinoches saines ont été collectées sur trois sites localisés en amont, sur et en aval de la zone où le parasitisme et les hémorragies avaient été constatés. Un ensemble de biomarqueurs incluant des enzymes de biotransformation (EROD, CYP3A et GST), des marqueurs du stress oxydant (GPx, TBARS), un indicateur de neurotoxicité (AChE) et des marqueurs de la perturbation endocrinienne (VTG, SPG, histologie de la gonade) a été mesuré. Les résultats acquis montrent que les poissons échantillonnés sur la zone d'étude se caractérisent par :

- Une activité élevée des enzymes de biotransformation qui peut s'expliquer par la contamination par les HAP qui est observée dans les sédiments ($16,4 \pm 1,2$ mg/kg) et qui sont fréquemment mesurées chez cette espèce [HOL 93] , [HOL 94].
- Une diminution modérée de l'activité AChE qui ne doit pas être forcément imputable à un stress neurotoxique.
- Une augmentation de la concentration en VTG circulante sur le point le plus aval. Ce résultat est cohérent avec la pression urbaine que subit cette zone.

Ces différents éléments sont des indicateurs allant tous dans le sens d'une pression chimique induisant un stress précoce. Cependant, excepté la VTG, les biomarqueurs d'exposition mesurés ne permettent pas de dire que la capacité d'adaptation est dépassée. Ils ne suffisent pas, au regard des connaissances actuelles, pour expliquer les phénomènes de mortalité et les épisodes hémorragiques rapportés dans ce cours d'eau. Dans ce contexte, la mesure de paramètres complémentaires incluant des biomarqueurs d'effets comme le statut immunitaire des poissons ainsi qu'un bilan sanitaire auraient été nécessaires pour confirmer un épuisement physiologique résultant d'une exposition prolongée. L'altération d'une grande fonction physiologique comme la défense immunitaire permettrait en effet d'établir un lien entre les observations macroscopiques effectuées sur les poissons et l'état de santé des organismes

1.2.3.3.2 Diminution des captures d'Ombre commun sur le plateau du Haut Allier

Depuis 2008, les pêcheurs du Haut-Allier observent une diminution des captures d'Ombre commun (*Thymalus thymalus*). Afin de comprendre l'origine de ce phénomène, des études portant sur l'altération hydro-morphologique du milieu ou encore la dégradation des frayères ont été initiées. Les résultats négatifs de ces travaux ont amené les acteurs locaux à envisager une perturbation en lien avec la présence de micro-polluants dans le milieu. Pour vérifier cette hypothèse, une étude a été mise en œuvre sur deux espèces de poissons présentes sur la zone d'étude : la truite fario (*Salmo trutta*) et le goujon. L'objectif de ce travail est d'évaluer trois mécanismes d'action des polluants chimiques pouvant expliquer la diminution des captures d'ombre commun :

- Des perturbations de la reproduction des poissons pourraient affecter le peuplement piscicole. Plusieurs travaux menés chez le poisson mettent en évidence un lien entre l'exposition à des perturbateurs endocriniens, des perturbations biochimiques, histologiques ou physiologiques de la reproduction et des atteintes au niveau des populations [KID 07]. Afin d'évaluer cette hypothèse, la VTG a été mesurée chez les poissons échantillonnés et une analyse histologique des gonades a été réalisée.
- Des effets neurotoxiques pourraient perturber le comportement des poissons et affecter les populations. De nombreux polluants environnementaux sont en effet connus pour leur capacité à inhiber l'AChE, perturbant ainsi la transmission de l'influx nerveux. Une exposition à ces molécules peut également induire des perturbations du comportement de fuite, de nage ou du comportement alimentaire des poissons susceptibles d'entraîner la mort de l'organisme et à terme des perturbations populationnelles [GAR 06], [VIE 09].
- Une immunosuppression pourrait accroître la sensibilité des individus aux maladies et perturber les populations de poissons. L'immunité est une fonction centrale chez le poisson visant à protéger ce dernier des agressions par les pathogènes. Toutefois, de nombreux contaminants sont connus pour diminuer les capacités de défense des organismes, augmentant ainsi leur susceptibilité aux maladies. De tels effets au niveau individuel pourraient avoir des conséquences au niveau du peuplement piscicole [BOL 01]. Afin de tester cette hypothèse, la distribution et la viabilité leucocytaire sont mesurées. De même, l'activité de phagocytose et la flambée oxydative basale qui sont deux paramètres impliqués dans la neutralisation et l'élimination des pathogènes sont étudiés.

Pour cette étude, des poissons adultes des deux espèces retenues (truite fario et goujon) ont été échantillonnés par pêche électrique sur deux sites situés en amont et en aval de la zone sur laquelle la diminution des captures a été observée. Les résultats obtenus montrent, sur chaque station, des concentrations en VTG faibles (de l'ordre de la centaine de ng/mL de plasma) chez les deux espèces. Associé à l'absence d'anomalie histologique au niveau du tissu gonadique, ce résultat invalide l'hypothèse basée sur l'exposition des poissons à des perturbateurs endocriniens œstrogéniques et plus généralement à des composés reprotoxiques. Inversement, les profils de réponse de l'activité AChE et des paramètres immunitaires montrent une différence significative ($p < 0.05$) entre les zones amont et aval de l'étude (Tableau 2.6).

Tableau 1.6 : Réponse des biomarqueurs mesurées chez les goujons (*Gobio gobio*). Les données sont présentées sous la forme moyenne \pm écart-type sauf pour la vitellogénine où elles sont reportées sous la forme de moyenne géométrique \pm intervalle de confiance. Le nombre de poissons utilisé pour la mesure des biomarqueurs sur chaque site est présenté. Les valeurs annotées avec des lettres différentes sont statistiquement différentes ($p < 0,05$).

En aval, les poissons présentent une inhibition de l'AChE de 31 et 27% respectivement chez la truite et le goujon, un résultat qui tend à signer l'exposition des poissons à des composés neurotoxiques. Des travaux de laboratoire montrent que des taux d'inhibition de l'AChE similaires peuvent induire des perturbations comportementales [VIE 09]. Cependant, aucune donnée ne permet de transposer cette relation in situ et donc de statuer sur le réel caractère prédictif de l'AChE sur le comportement des poissons. Concernant les paramètres immunitaires, les truites et les goujons échantillonnés en aval de la zone d'étude se caractérisent par une augmentation de la mortalité cellulaire associée à une déstabilisation leucocytaire marquée par la réduction du pool de granulocytes/macrophages. Si ce phénomène tend à être compensé par une augmentation de l'activité de phagocytose (environ 8%), les capacités de dégradation des corps étrangers restent amoindries du fait de la diminution de la flambée oxydative basale. Les poissons vivant en aval du secteur étudié apparaissent donc comme immunodéprimés. Ces résultats sont en accord avec les données disponibles dans la littérature scientifique montrant l'impact de la contamination chimique du milieu sur la réponse immunitaire [SAR 04]. Toutefois, seule la conjonction avec une pathologie pourrait expliquer un déclin des populations. Aussi, une analyse anatomo-pathologique a été mise en œuvre sur les poissons échantillonnés. Cette dernière révèle, chez le goujon, une contamination par le ver monogène *Gyrodactylus* sp. et par un protozoaire cilié *Trichodina* sp. La

faible abondance de ces deux parasites semble toutefois insuffisante pour expliquer un déclin des populations piscicoles mais valide le statut d'immunodépression des individus.

Cette étude, réalisée dans un contexte de déclin piscicole, permet d'émettre des hypothèses relatives au lien entre les expositions et la réponse des poissons aux micro-polluants et les altérations populationnelles observées dans le milieu. Toutefois, le manque de connaissances sur le lien entre les effets précoces des contaminants mesurés au niveau biochimique ou histologique et la santé des peuplements piscicoles ne permet pas de statuer sur les causes absolues du déclin observé. Si les effets neurotoxiques et immunotoxiques pourraient être impliqués, ces hypothèses doivent encore être étayées par une approche plus approfondie de l'infestation parasitaire des poissons mais également par l'intégration de paramètres en lien avec le statut nutritionnel des individus.

1.2.3.3 Anomalies morphologiques chez des goujons en aval d'un rejet industriel

En 2008, des pêcheurs rapportaient la présence de goujons présentant un gonflement de l'abdomen associé à une hypertrophie des gonades dans une rivière, la Dore (Puy de Dôme) soumise à des rejets d'origine urbaine (deux stations d'épuration de 8100 et 1800 EH) et recevant également les effluents d'une industrie [SAN 11]. Afin de déterminer les causes de ces anomalies morphologiques, des prélèvements de goujons ont été réalisés par pêche électrique au cours de l'automne 2008 et 2009 sur 3 sites dont 2 sont situés en aval des effluents urbains et industriel (figure 2.14).

Figure 1.14 : Représentation schématique de la zone d'étude. Les flèches localisent les rejets des stations d'épuration des eaux usées urbaines (STEP) et de la station d'épuration des eaux industrielles (Industrie). Les deux points sur le cours d'eau indiquent la position des stations d'échantillonnage par rapport aux différents rejets.

En raison de la possible implication de polluants perturbateurs endocriniens dans les effets observés, des paramètres liés à la fonction de reproduction ont été mesurés sur chaque poisson :

- La vitellogénine (VTG) qui est un indicateur d'oestrogénicité bien connu chez le poisson [SUM 95] a été mesurée dans le sang afin de caractériser une éventuelle exposition à des perturbateurs endocriniens.
- Une analyse histologique du tissu gonadique a été réalisée afin de confirmer le sexe des poissons et de mettre en évidence des perturbations du tissu reproducteur. Le premier type de perturbation examiné est la présence d'intersexe c'est-à-dire de cellules femelles dans des gonades mâles ou inversement. D'autres anomalies comme les fibroses ou les nécroses sont également recherchées.
- L'indice gonado-somatique qui traduit le poids relatif des gonades dans le poisson a également été calculé afin de mettre en évidence une atteinte au niveau de l'organe reproducteur.

Les goujons échantillonnés en aval des rejets se caractérisent par une induction significative de la VTG et une importante intersexualité gonadique par rapport aux poissons provenant du site amont. Ce résultat confirme l'implication de polluants perturbateurs endocriniens dans les effets observés. De plus, l'analyse du sex-ratio des populations de goujons rencontrées sur les sites d'étude montre un déséquilibre de ce paramètre avec, sur les sites en aval des rejets, une diminution du nombre de goujons femelles au profit des individus intersexués (figure 2.15). Ce profil de réponse apparaît comme atypique. En effet, peu d'études scientifiques décrivent la masculinisation des populations sauvages alors que la féminisation est plus couramment observée notamment en aval des stations d'épuration urbaines. Les réponses observées semblent toutefois cohérentes avec la nature du rejet industriel provenant d'une installation impliquée dans la production de substances hormonales telles que la dexaméthasone et la spironolactone dont les effets masculinisant sont décrits au travers d'études réalisées en laboratoire [HOW 94], [HAT 09].

Figure 1.15 : Analyse du sexe-ratio de la population de goujon (*Gobio gobio*) échantillonnés en 2008 et 2009. Les effectifs représentent le nombre de poissons analysés au cours de deux années.

Dans cette étude, la mise en œuvre d'une batterie de biomarqueurs a permis de mettre en évidence l'existence d'un phénomène de perturbation endocrinienne chez les poissons échantillonnés en aval de rejets urbains mais aussi industriel. Afin d'évaluer une éventuelle conséquence de ces perturbations de la fonction de reproduction au niveau du peuplement piscicole, une étude populationnelle a été réalisée en parallèle sur les deux sites étudiés.

Les résultats obtenus mettaient alors en évidence une diminution significative de la densité de poissons entre l'amont et l'aval de la zone d'étude, cette dernière passant de 301 à 74 individus pour 938 m² [SAN 11] ; un résultat qui montre le lien entre les perturbations individuelles et populationnelles.

1.2.3.3.4 Conclusion : Avantages et limites des biomarqueurs dans un contexte d'investigation environnementale

Les trois études de cas présentées ci-dessus mettent en évidence le potentiel de la mesure d'un ensemble de biomarqueurs pour apporter des éléments de compréhension à des perturbations environnementales mises en évidence au niveau individuel voire populationnel.

Contrairement au déploiement des biomarqueurs au sein d'un réseau, dans le cadre d'une enquête environnementale, les observations disponibles au préalable permettent de cibler les paramètres à mesurer et donc de réduire le coût des études et le temps nécessaire à leur réalisation. L'étude sur la Dore illustre parfaitement ce propos. La présence de poissons avec une hypertrophie des gonades oriente le diagnostic vers un phénomène de perturbation endocrinienne. Aussi, la batterie de biomarqueurs mise en œuvre se limite à 3 indicateurs spécifiques qui permettent, in fine, de collecter les informations nécessaires au diagnostic.

La question de la référence est également simplifiée. Ce type d'étude se déroule généralement sur des zones géographiques restreintes voire même sur un tronçon d'un cours d'eau unique. La référence qui sera utilisée pour interpréter la réponse des biomarqueurs est alors positionnée en amont de la zone anthropisée. Malgré cette apparente simplicité, certaines précautions sont nécessaires. La plupart des espèces de poissons étant mobiles, il faut effectivement s'assurer que les individus vivants sur les sites d'étude ne puissent pas communiquer avec le site de référence soit du fait de barrages physiques soit en raison d'une distance importante.

Dans les enquêtes environnementales, le choix de l'espèce à utiliser reste une question complexe mais majeure. Parmi les 104 espèces de poissons peuplant les milieux aquatiques continentaux métropolitains [KEI 01], peu sont utilisées par les écotoxicologues à des fins opérationnelles. On peut par exemple citer des Cyprinidés tels que le cheveine, le gardon et le goujon ainsi que d'autres espèces plus rares comme l'épinoche et le chabot. Deux critères supportent généralement le choix des espèces de poissons utilisées comme sentinelles :

- La représentativité géographique (incluant la densité des populations) au niveau d'un territoire ou au niveau du cours d'eau qui permet d'envisager une utilisation plus ou moins large de l'espèce considérée comme modèle biologique.
- La bonne connaissance de la biologie de l'espèce qui garantit une meilleure compréhension des réponses physiologiques mesurées chez des poissons provenant de milieux anthropisés et qui permet une mise en œuvre optimale des biomarqueurs.

Les études sur l'Escrière et la Dore apparaissent comme des cas idéaux où les espèces à l'origine de l'étude (respectivement l'épinoche et le goujon) sont des espèces modèles pour la mesure des marqueurs d'intérêt. Ce n'est pas le cas sur le Haut-Allier où l'Ombre commun dont le déclin était le point de départ des travaux, est une espèce avec une forte valeur patrimoniale pour laquelle il existe peu de données et d'outils écotoxicologiques validés sur l'espèce. La stratégie proposée a donc consisté dans l'échantillonnage de deux espèces d'accompagnement de l'Ombre commun mieux connues en écotoxicologie à savoir la truite et le chabot qui étaient abondants dans la zone d'étude.

1.2.3.4. En marche vers l'application réglementaire des biomarqueurs

Les différentes études présentées dans ce chapitre mettent en avant le potentiel des biomarqueurs mesurés chez des poissons collectés *in situ* pour la surveillance des masses d'eau. Ces outils apportent une information sur l'état de santé des poissons qui est mis en relation avec des perturbations observées au niveau individuel et populationnel. Il est toutefois à noter qu'à eux seuls, les biomarqueurs ne permettent d'établir un diagnostic environnemental complet. Ils sont un élément de la chaîne d'information et doivent être placés dans une démarche multi-paramétrique combinant analyses physico-chimiques, mesures d'effets biologiques et études populationnelles. Cette chaîne d'information permettra de faire le lien entre les perturbations mesurées et les

causes environnementales, naturelles ou anthropiques, de ces perturbations.

Malgré cet intérêt évident, les biomarqueurs ne sont pas encore utilisés dans les programmes de surveillance réglementaire des masses d'eau continentales. Ce constat peut, au moins en partie, s'expliquer par la diversité des outils disponibles et par le manque de maturité de certains d'entre eux ainsi que l'absence de normalisation des méthodes de mesure des biomarqueurs [SAN 09] , [SAN12]. Il semble donc important de mettre en œuvre ce travail de normalisation afin que les biomarqueurs puissent contribuer utilement à la surveillance de la qualité des écosystèmes aquatiques.

1.2.4. Recherche d'effets et de leurs causalités en milieu estuarien : l'intersexualité chez les scrobiculaires

1.2.4.1 Introduction

L'écotoxicologie est une discipline particulièrement pertinente lorsqu'elle met en évidence des perturbations de l'environnement. L'observation de dérèglements et de perturbations de la physiologie des organismes a toujours été une alerte conduisant à la compréhension des effets environnementaux et souvent à la mise en place d'actions de gestion. A contrario, la mesure et la quantification de composés chimiques contaminant l'environnement ne sont que peu interprétables puisque leur signification dépend de nombreux facteurs physico-chimiques (en particulier de la spéciation et la disponibilité), environnementaux (facteurs physiques, variabilité de la dispersion), biologiques (présence d'organismes et de cibles biologiques dont l'atteinte et l'expression est elle-même dépendante de nombreux facteurs biochimiques, structuraux et physiologiques). Ainsi la quantification de composés chimiques exogènes dans un compartiment donné (y compris le biote), si elle indique un danger potentiel (dépassement de valeurs seuils) n'a de signification réelle pour le milieu que si la biologie vient la lier à un effet délétère *in situ*.

L'étude des êtres vivants, de leurs structures et des fonctions physiologiques associées ainsi que leurs dysfonctionnements est un moteur évident de la progression de la connaissance et une force certaine dans la mise en œuvre d'actions de gestion, de préservation ou de remédiation de l'environnement (Minier et Amara, 2016). L'exemple des perturbateurs endocriniens est très illustratif. Il est très significatif que le qualificatif de ce vaste ensemble de composés ne soit pas celui d'une famille chimique –comme les historiques métaux lourds, organochlorés ou autres hydrocarbures- mais fasse référence à un mécanisme physiologique. Depuis leur désignation à partir d'observations de perturbations des physiologies animales et humaines, de nombreux progrès scientifiques ont été faits au cours de multiples plans d'action concernant les perturbateurs endocriniens.

Les perturbateurs endocriniens touchent un système si nécessaire et fondamental à la vie – au développement, au métabolisme, à la reproduction- que les conséquences d'une exposition à ces molécules alertent et nourrissent aisément l'inquiétude des scientifiques et des gestionnaires. Ainsi des effets tels que des modifications de sexe phénotypique des poissons (voir la partie sur l'état de santé des poissons) sont très parlants et suscitent des développements scientifiques et l'engagement d'actions réglementaires. Les perturbations biologiques – ou biomarqueurs- particulièrement s'ils indiquent une altération de la survie, du développement, de la reproduction ou du comportement ont une force démonstratrice et évocatrice qui illustrent la pertinence des biomarqueurs pour identifier un danger pour les populations.

Ce paragraphe relate les recherches qui ont été menées pour étudier des perturbations de la reproduction observées chez des mollusques bivalves vivant en milieu intertidal, les scrobiculaires (figure 2.16), *Scrobicularia plana*, ainsi que la démarche adoptée dite « dirigée par les effets biologiques » (ou EDA pour effect-directed analysis) pour en rechercher les causalités.

Figure 1.16 : Scrobiculaires (*Scrobicularia plana*) prélevées en Baie de Saint Brieu. Ces mollusques bivalves vivent enfouis dans le sédiment. La barre noire représente 10 mm (image : Réserve Naturelle de Saint Brieu)

1.2.4.2 L'intersexualité chez *S. plana*: occurrence et sévérité

Un organisme intersexué est un organisme possédant à la fois des caractéristiques mâles et femelles. Cette situation pour une espèce à sexes mâle et femelle séparés (dite gonochorique) est l'indication d'une perturbation liée à une mauvaise signalisation ou interprétation de signaux moléculaires conduisant à une différenciation sexuelle non adaptée. Ceci a été décrit pour de nombreuses espèces de poissons se développant sous l'influence de perturbateurs endocriniens. Le phénotype « intersexué » peut se décliner à différents niveaux de l'organisation biologique, c'est-à-dire à travers des modifications moléculaires, cellulaires et tissulaires mais l'une des manifestations les plus importantes est le développement simultané de cellules femelles et de cellules mâles au sein d'un même organe reproducteur. Chez les scrobiculaires, on observe des ovocytes dans les testicules : des cellules à l'origine de l'œuf dans un organe dont le rôle est de produire les spermatozoïdes !

Les scrobiculaires (*Scrobicularia plana*) sont des mollusques bivalves vivant enfouis dans les sédiments des zones intertidales des estuaires des côtes atlantiques européennes et présentent des sexes séparés, mâles et femelles, selon les études historiques [HUG 71] , [RUI 93] , [ROD 03]. Cependant, dès 1956, 4% des scrobiculaires vivant dans l'estuaire urbanisé et industrialisé du Tage au Portugal présentaient des organes sexuels à la fois mâles et femelles. Cette observation a été renouvelée et le phénomène semble s'être développé puisque certains sites en Angleterre et au Portugal ont présenté jusqu'à 70% d'individus intersexués [LAN 07] , [GOM 09]. Le phénotype observé semble correspondre à une féminisation car la somme des individus mâles et intersexués s'équilibre avec la quantité des femelles dénombrées dans les sites ou se maintient le sex-ratio à 50-50 [CHE 06]. Cette féminisation se caractérise par la présence plus ou moins importante d'ovocytes dans le tissu testiculaire et une graduation en six stades d'intersexualité a été formalisée [CHE 06].

Entre 2009 et 2012, quatre campagnes de prélèvements ont été entreprises pour, notamment, décrire l'état des populations des scrobiculaires le long des côtes nord-atlantique françaises et anglaises [FOS 12] , [POP 15]. Plus de 3500 bivalves ont été prélevés sur 120 sites d'études à raison de 30 individus par site. Chaque mollusque a fait l'objet de diverses mesures et d'un examen histologique ou microscopique des organes reproducteurs. Les résultats montrent que 62,5% des sites étudiés abritent des individus intersexués. La proportion est de 52% des sites explorés en Angleterre et de 77% des sites français (figure 2.17). La prévalence du phénotype varie de façon importante selon les sites, allant de 0 à 71% des mâles d'un site donné présentant des testicules avec des ovocytes. Au total, 202 intersexués ont été caractérisés représentant 11,8% des mâles sur l'ensemble de la zone d'étude ou 18,4% en ne considérant que les côtes françaises.

L'étude de la sévérité de l'intersexualité montre que les phénotypes couvrent l'ensemble de l'échelle de score. Cependant une très grande majorité des cas (72,3%) ne correspond qu'aux trois premiers stades. Les cas les plus sévères ne sont pas nécessairement associés avec un nombre important de mâles féminisés dans la population du site ou de la zone d'étude. Par exemple, la sévérité est importante (majorité de cas en stades 5-6) sur la Vilaine ou en baie de Daoulas bien que le nombre de mâles affectés soit limité (43 et 19% respectivement). Le phénotype est donc largement disséminé sur les côtes françaises et anglaises mais la sévérité est dépendante du site.

Figure 1.17 : Pourcentage de scrobiculaires des côtes françaises présentant des ovocytes au sein des testicules. Cette « anomalie » caractérise des organismes intersexués. Trente individus ont été analysés par site entre 2009 et 2012 ($n_{total}=1481$) (d'après [POP15] ; [FOS 12]).

1.2.4.3. Facteurs confondants : taille, sex-ratio et parasites

Il est important que l'étude du phénotype ne soit pas affectée par des facteurs pouvant altérer l'interprétation d'une réelle incidence de l'intersexualité sur le territoire. Langston et collaborateurs ont remarqué que le phénotype est d'autant plus observable que les individus sont à parvenus à maturité sexuelle [LAN 07]. Une attention particulière a donc été portée sur l'échantillonnage et notamment sur le développement des scrobiculaires. L'objectif était de ne prélever que des individus homogènes et sexuellement matures. Cependant, malgré la volonté de ne choisir que des individus de 40 mm, l'étude des tailles (de la coquille) et des masses (des tissus frais) des prélèvements montre qu'une variation peut être observée selon les sites. Aucune tendance ne semble cependant se dégager de cette constatation. Certaines populations semblent légèrement plus petites que

d'autres (taille moyenne selon les sites de 35 à 49,2 mm) sans effet sur la présence d'intersexués. L'analyse statistique des ratios masse/taille ne montre, elle, aucune différence entre les populations. Les individus intersexués ont cependant des ratios masse/taille légèrement réduits par rapport aux femelles mais non différentes des mâles. Ainsi il n'y a pas de différence entre les mâles et les intersexués.

La répartition des mâles et des femelles au sein des prélèvements a été étudiée afin de vérifier que le ratio n'était pas biaisé. Sur l'ensemble de l'étude, la proportion de mâles est de 48,6%, ne montrant donc pas d'écart significatif par rapport à l'équilibre numérique. Cependant, sept sites montrent une proportion significativement plus importante de femelles. Inversement 10 sites montrent une proportion significativement déviée en faveur des mâles. Aucune relation avec la proportion d'intersexués ou la sévérité des cas n'est apparente sur chacun de ces sites. Parmi ces sites, certains présentent des intersexués, d'autres non. La présence d'intersexués est révélée sur une majorité de sites sans déviation du sex-ratio.

La présence de parasites est un des déterminants de l'intersexualisation chez certains organismes, en particulier chez des crustacés [FOR 06]. Les parasites internes ont été recherchés par observation microscopique chez 85% des individus de l'étude. La présence de parasites et notamment de ciliés a ainsi pu être observée pour 45% des individus analysés. L'analyse statistique indique que des différences significatives existent quant au taux d'infestation entre mâles, femelles et intersexués. Les individus mâles sont significativement plus affectés que les femelles et que les intersexués avec respectivement 75%, 22% et 26% de parasites observés (figure 2.18). Aucune association entre parasites et intersexualité ne semble exister chez les scrobiculaires. Les individus intersexués sont bien moins affectés que les mâles et présentent ainsi un phénotype proche des femelles.

Figure 1.18 : Pourcentage de scrobiculaires de la zone d'étude (n=3149) présentant des parasites internes identifiés par microscopie (essentiellement ciliés et trématodes, d'après [POP 15]).

Ces différentes études indiquent donc que les observations ne sont pas modifiées par les facteurs confondants identifiés. La causalité de l'intersexualité est vraisemblablement liée à d'autres facteurs tels que l'exposition à des xénobiotiques.

1.2.4.4 Identification du mécanisme moléculaire

La large distribution de scrobiculaires intersexués sur les côtes françaises et anglaises apporte un éclairage assez particulier sur l'état de santé des mollusques et des perturbations les affectant. Cependant, cette observation ne dit rien sur les mécanismes sous-jacents et les chaînes causales. De plus, l'endocrinologie et les mécanismes moléculaires présidant au développement des organes reproducteurs sont encore mal connus chez les mollusques. Ainsi pour apporter quelques informations sur les événements moléculaires conduisant à l'intersexualisation, une analyse comparative des gènes exprimés chez les mâles normaux et chez les mâles intersexués a été menée (par hybridation soustractive ou SSH) , [CIO 12].

Quatre-vingt-dix séquences géniques ont été isolées et clonées à partir des organes reproducteurs. La recherche de gènes homologues dans les bases de données n'a cependant permis d'identifier qu'un tiers des gènes isolés. Les deux tiers de séquences sans homologues correspondent vraisemblablement à des gènes spécifiques ou trop différents des séquences connues. Parmi les séquences identifiées, des gènes impliqués dans la signalisation cellulaire, la division, le développement spermatique, le métabolisme, la synthèse protéique et le cytosquelette sont retrouvés montrant qu'un ensemble de processus sont nécessaires dans le bon développement des organismes et en particulier pour le développement des organes reproducteurs.

Une validation de l'expression différentielle entre intersexués et mâles normaux a été opérée par amplification génique quantitative (qPCR) sur 10 extraits gonadiques d'individus dont le phénotype a été caractérisé par microscopie (intersexués de stade 2). Les résultats des niveaux d'expression sont profondément différents avec un facteur supérieur à 10 dans 6 cas sur 7 (figure 2.19). Parmi les gènes qui semblent peu exprimés chez les scrobiculaires intersexués, plusieurs peuvent retenir l'attention. RACK1 est une protéine importante dans la signalisation cellulaire. Elle est impliquée dans la signalisation androgénique et a été déjà identifiée chez des mollusques affectés par le TBT [SIA 07]. PCNA est une protéine importante du cycle cellulaire fortement exprimée en début de spermatogénèse chez l'huitre [FRA 10]. Les deux gènes SPL et tektin3 sont impliqués

dans la morphologie spermatique et semblent déterminants dans la fertilité [ROY 09]. Ainsi, ces quelques indices semblent indiquer que, chez les scrobiculaires intersexués, certains mécanismes importants pour le développement des cellules reproductives mâles soient inhibés.

Figure 1.19 : Niveau d'expression de quelques gènes identifiés par hybridation soustractive et analysés par qPCR chez les mâles normaux et intersexués (n=10, d'après [CIO12]).

1.2.4.5 Recherche des composés responsables : l'approche EDA

Par analogie avec le phénomène de féminisation des poissons, des recherches d'agents responsables de la féminisation des scrobiculaires ont porté sur des composés à activité œstrogénique. Langston et collaborateurs ont exposés des scrobiculaires en fin de maturation sexuelle pendant un mois en aquarium en présence de fortes concentrations d'œstradiol et d'éthinyl-œstradiol dans les sédiments (100 µg/kg) sans obtenir d'intersexualisation. L'exposition pendant un mois à un mélange d'œstradiol et d'éthinyl-œstradiol, d'octyl- et de nonyl-phénols dès le début de maturation des gonades suivi par une transplantation (4 mois) des animaux dans un estuaire de référence a cependant permis d'obtenir 44% d'individus intersexués (contre 8% chez les témoins) [LAN 07].

La physiologie de la reproduction des mollusques est différentes de celle des poissons et, en particulier, le rôle exact des stéroïdes dans la reproduction des bivalves est incertain [KET 08], [SCO 12]. De plus, la recherche de mécanismes génétiques laisse penser que l'intersexualisé chez les scrobiculaires corresponde à une inhibition des caractères masculins. Enfin, chez les poissons, la présence de composés anti-androgéniques permet de fortement potentialiser la féminisation des poissons [LAN 15]. Ainsi, la présence de composés anti-androgéniques pourrait contribuer aux dysfonctionnements des systèmes endocriniens des organismes aquatiques.

Une recherche de composés à activité anti-androgénique a été conduite sur les sites anglais et français où ont été prélevés les scrobiculaires pour l'étude de l'intersexualisation. Cette recherche a consisté en plusieurs étapes permettant à la fois de documenter l'occurrence de composés anti-androgéniques sur les lieux d'étude et de tenter d'identifier les composés responsables de l'activité selon la démarche dite EDA ou dirigée par les effets (figure 2.20). Après la réalisation d'extraits organiques effectués à partir de sédiments ou de tissus de scrobiculaires, la détection ne s'est pas dirigée vers des composés spécifiques mais, au contraire sans a priori, sur la capacité de l'extrait à entraîner une réponse anti-androgénique comparable à un composé anti-androgénique modèle, le flutamide (flu), sur des cellules exprimant le récepteur androgénique humain (test AR-Calux).

Figure 1.20 : Diagramme de la démarche permettant l'identification de composés environnementaux actifs (démarche EDA). Les composés sont identifiés grâce à la détection de leur activité (anti-androgénique dans le cas présent) par un test biologique puis par recherche des structures chimiques associées.

Les résultats indiquent qu'une activité anti-androgénique peut être détectée sur 92% des sites anglais et sur 45% des sites français de l'étude [ALV 15]. Les niveaux d'activité sont très variables allant de valeurs proches de la limite de détection (0,2 µg équivalent flutamide/g = µg Flu eq/g) à plus de 200 µg Flu eq/g. Trois niveaux d'activité peuvent être distingués : les sites présentant de faibles activités, de l'ordre de quelques µg Flu eq/g ; des sites de niveau intermédiaire avec quelques dizaines de µg Flu eq/g et des sites particulièrement pollués dépassant les 50 µg Flu eq/g. Ainsi trois estuaires se distinguent particulièrement : l'estuaire de Southampton, l'estuaire de Poole et celui de la Seine avec des valeurs supérieures à 75 µg Flu eq/g.

Afin d'identifier les composés responsables de l'activité biologique, certains échantillons ont été fractionnés par chromatographie ultra performante (uHPLC) afin d'isoler les composés actifs dans des sous-échantillons qui ont été analysés par spectrométrie de masse à temps de vol (TOF-MS). Ainsi des profils d'activités ont été

obtenus (figure 2.21). Ceux-ci montrent, contrairement aux profils classiques obtenus pour une activité œstrogénique, la présence d'un nombre important de fractions actives et donc, potentiellement, la contribution de très nombreux composés anti-androgéniques. Parmi ces composés se trouvent le triclosan, le chlorophène, l'acide abiétique et, de façon assez inattendue, de nombreux hydrocarbures polycycliques dont le fluoranthène. Cette « surprise » a fait l'objet d'une confirmation de l'activité anti-androgénique *a posteriori* par la mesure de l'activité des composés purs sur le biotest [ALV 15].

Figure 1.21 : Profil d'activité anti-androgénique d'extraits (deux répliques A et B) de sédiments de la Seine montrant la présence de composés actifs dans un nombre important de fractions obtenues par séparation sur colonne chromatographique (selon différents temps d'éluion).

1.2.4.6 Conclusions et perspectives

L'identification de perturbations physiologiques sur les organismes dans leur milieu est un signal fort conduisant de façon pertinente les écotoxicologues à interroger les dysfonctionnements de l'environnement. Les zones Manche et Atlantique des côtes françaises et anglaises présentent des conditions conduisant à la présence très répandue de mollusques bivalves intersexués. Bien que les conséquences à long terme sur les populations de mollusques ne soient encore que spéculatives, il est notable que cette observation complète le tableau des dysfonctionnements déjà observés en termes d'intersexualité chez les poissons et les crustacés.

Les travaux engagés sur les scrobiculaires illustrent les démarches des écotoxicologues visant (1) à obtenir une information pertinente et objective de la situation de l'environnement par la surveillance des milieux, (2) à rechercher les déterminants des perturbations par des approches combinant l'analyse chimique et écotoxicologique et (3) à analyser les mécanismes présidents à l'occurrence du phénomène en développant les connaissances fondamentales. Ces recherches nécessitent un effort collectif et transdisciplinaire et qui, dans le cas présent, mettent au cœur la biologie et ses dysfonctionnements.

Il est important de concevoir que les travaux réalisés n'apportent pas d'éléments définitifs pour conclure précisément sur l'ensemble des causes de ces perturbations ni sur leurs conséquences à long terme. Beaucoup reste encore à faire. Le phénomène d'intersexualité des bivalves est établi et interroge sur ses conséquences écologiques. Les gènes dont l'expression est perturbée chez les intersexués constituent un ensemble de pièces d'un puzzle encore non ordonné dans un schéma mécanistique, qui reste à finaliser. Enfin, l'identification de très nombreux composés à activité anti-androgénique présents dans les sédiments estuariens et dans les tissus des bivalves n'implique pas que ces composés soient les responsables –ou les seuls responsables– des dysfonctionnements biologiques. La consolidation de nos connaissances et de la compréhension des phénomènes reste donc un challenge important. La traduction de ces observations en plan de gestion nécessitera encore des travaux mais les gestionnaires disposent déjà d'informations importantes : des dysfonctionnements majeurs de la reproduction sont observés sur nos côtes, un mécanisme d'action est exploré et nous avons déjà une liste de suspects. Ceci devrait constituer une base solide incitant à l'action

1.2.5 Les indicateurs écotoxicologiques chez les organismes marins : de la recherche à la réglementation pour la surveillance

Ce paragraphe présente une étude de cas intégrant une expérience franco-européenne menée sur le site pilote de la Baie de Seine pour (i) développer des indicateurs écotoxicologiques applicables à la surveillance de la qualité du milieu marin et pour (ii) transposer ces indicateurs dans le cadre réglementaire de la Directive Cadre sur le Milieu Marin (DCSMM) afin d'évaluer le «bon état écologique» du milieu marin.

1.2.5.1 Vingt-cinq années d'évolution méthodologique pour atteindre un consensus Européen

Dans le milieu marin, les travaux de recherche en écotoxicologie menés pour des applications en surveillance ou l'évaluation du risque chimique ont été initiés par quelques universités Françaises (Groupe d'Interface chimie biologie écosystèmes marins: GICBEM 1987) mais ils ont pris un véritable essor à partir des années 1990 avec l'implication d'instituts nationaux comme l'Ifremer, l'Inra, l'Irstea puis les universités (figure

2.22).

C'est lorsque les paradigmes de l'écotoxicologie ont été plus solidement établis à la fin des années 1990, avec la contribution de l'université de Metz que nombre d'universités françaises se sont complètement appropriées la discipline pour lancer les premiers enseignements d'écotoxicologie et les travaux de recherche associés. Comme toutes les disciplines scientifiques nouvelles, l'écotoxicologie a été confrontée dans sa construction à des verrous scientifiques, à la critique scientifique de disciplines associées comme la biogéochimie ou l'écologie, tout en devant répondre à une forte demande sociétale. Longtemps considérée comme une discipline scientifique appliquée, l'attente des gestionnaires dépassait les connaissances scientifiques alors disponibles en écotoxicologie. L'écotoxicologie s'est donc construite dans cette dualité, acquérir des connaissances à long terme et répondre rapidement à l'évaluation du risque toxique en fournissant des outils de diagnostic et de prédiction. Et, aujourd'hui, l'écotoxicologie apporte des connaissances et des outils applicables en surveillance ainsi que des données utilisables pour l'évaluation du risque chimique. Ces deux approches peuvent être utilement combinées comme nous le verrons dans le cas de la mise en œuvre de la Directive cadre sur l'eau en zone littorale (DCE) ou de la DCSMM.

Figure 1.22: Schéma synoptique de l'évolution internationale et nationale de l'écotoxicologie pour la surveillance marine. L'écotoxicologie s'est construite dans les années 1980 sur la base de projets de recherche internationaux (GEEP et GICBEM). L'appropriation française s'est déroulée pendant les années 1990 en estuaire contaminé (Seine Aval), pour le naufrage du pétrolier ERIKA puis suivant une structuration de la communauté avec 3 GDR.

(SEFA: Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée; GEEP: Group of the Experts on the Effect of Pollutant; GICBEM: Groupe d'Interface chimie biologie écosystèmes marins; ICES: International Council for the Exploration of the Sea; IOC: Intergovernmental Oceanographic Commission; JAMP: Joint Assessment Monitoring Programme; OSPAR: Commission d'Oslo et Paris; BECPELAG: Biological effects of contaminants in marine pelagic ecosystems; RAMOGE: accord biosurveillance Raphaël-Monaco-Genes, BIOMAR: Biomarkers in marine organisms: a practical approach; BEEP: Biological effects of environmental pollution in aquatic ecosystems; WIKIMON: Workshop on Integrated MONitoring of contaminants and their effects in Coastal and Open-sea areas, SGIMC: Study Group on Integrated Monitoring of Contaminants and Biological Effects; ICON: integrated contaminant monitoring; HASEC; Seine Aval: Programme de recherche national sur la Seine aval; ERIKA: Naufrage du pétrolier ERIKA; EROD: Ethoxyrésorufine-O-dééthylase; IMPOSEX: premier biomarqueur obligatoire chez *Nucella Lapilus*; GDR IMOPHYS: Groupe de recherche Intégration de réponses MOLéculaires et PHYSiologiques aux contaminants chimiques en milieu côtier; GDR I EXECO: Exposition aux contaminants et effets Ecotoxicologiques le long du continuum milieu continental-milieu côtier; GDR EA: Groupe de recherche en Ecotoxicologie Animale, Pds DCSMM: Plan de surveillance de la Directive cadre sur le milieu marin)

Dans un contexte de construction de la discipline écotoxicologie, l'exemple du milieu marin présente un caractère singulier. En effet, les développements scientifiques et techniques menés pour la surveillance du milieu marin sont aujourd'hui les plus abouties, alors que les tests normalisés applicables pour l'évaluation du risque chimique ou la réglementation REACH en milieu marin sont moins développés qu'en milieu d'eau douce. Sur une cinquantaine de tests normalisés Afnor produits pour le milieu aquatique (Commission de normalisation Afnor qualité de l'eau TA90; <http://nnrominfo.afnor.org>), moins d'une dizaine ont été développés sur des espèces marines. Le milieu marin possédant une biodiversité plus riche que le milieu d'eau douce, une capacité de dilution spatiale des masses d'eaux plus grande, et une gestion par grandes masses d'eaux pourrait expliquer deux stratégies différentes menées pour la surveillance des eaux continentales ou marines. La surveillance des impacts toxiques s'est ainsi construite dans les eaux continentales sur la base de projets de recherche nationaux ou internationaux sans lien avec une structuration internationale. La surveillance des substances dangereuses dans les eaux européennes a été élaborée sur la base d'un consensus international et en soutien à l'évaluation de la qualité de zones marines.

La pertinence et l'originalité des travaux de terrain menés dans le milieu marin repose sur l'existence de plates-formes scientifiques européennes (Conseil International pour l'exploitation de la mer créée pour l'Atlantique Nord Est en 1885 ou la commission internationale pour l'exploration scientifique de la méditerranée créée en 1910). Ces plate-formes sont spécialisées aujourd'hui dans l'évaluation des captures de poissons et l'évaluation des niveaux et tendances à long terme des substances dangereuses. Ces plate-formes scientifiques viennent en appui de plusieurs conventions de mers régionales adoptées en Europe dans les années 1970 (Conventions d'Helsinki mer Baltique, Oskar atlantique Nord-Est, Barcelone Méditerranée, Bucarest en Mer Noire). Ces conventions marines européennes constituent un cadre réglementaire dédié au développement scientifique et au transfert méthodologique pour la surveillance des substances dangereuses (figure 2.21).

Figure 1.23 : Illustration des cinq zones géographiques Ospam en Atlantique Nord-Est (Sources : <https://www.ospar.org/convention/the-north-east-atlantic>). (I Arctique; II Mer du Nord; III Mer Celtiques; IV Golfe de Gascogne et côtes Ibériques; V Large Atlantique).

C'est la rencontre annuelle des scientifiques des différents pays contractants des conventions marines qui depuis vingt-cinq ans a permis de construire une méthodologie de surveillance fondée sur un consensus international. Ce dispositif unique au monde constitue pour les façades françaises de l'Atlantique et la Méditerranée, l'un des fondements essentiels des travaux menés pour développer le descripteur des contaminants chimiques et effets biologiques (D8). Ce descripteur constitue l'un des onze descripteurs de la Directive Cadre sur le Milieu Marin (Tableau 2.7). Initiée en juin 2008, la DCSMM apporte un cadre réglementaire plus contraignant que les conventions des mers régionales. Reposant sur une approche écosystémique la DCSMM constitue le pilier environnemental de la surveillance marine. La conférence des Nations Unies de Rio de Janeiro en 1992 « sommet planète-terre » et la convention sur la diversité biologique sont à l'origine des premiers accords internationaux majeurs plaçant l'approche écosystémique au cœur de la politique marine européenne.

Tableau 1.7 : 11 descripteurs de la Directive cadre sur le milieu marin. La définition du Bon État Écologique suivant 11 descripteurs est issue de travaux scientifiques menés depuis 2010 par différents établissements (ANSES, BRGM, CNRS, Ifremer, MNHN, SHOM) sous la coordination scientifique et technique de l'Ifremer et de l'Agence des Aires Marines Protégées. Le descripteur 8 a pour objectif d'évaluer les niveaux de contamination chimiques n'entraînant pas d'effets sur l'écosystème (Extrait du de l'arrêté du 18 décembre 2012 relatif aux critères et méthodes à mettre en œuvre pour l'élaboration des objectifs environnementaux et indicateurs associés du plan d'action pour le milieu marin. Journal Officiel de la République Française. Texte 91 sur 168. Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie)

1.2.5.2. Développement méthodologique de l'approche intégrée de chimie et écotoxicologie en Atlantique Nord-Est.

Le développement méthodologique de la surveillance des effets biologiques en Europe s'est construit sur la base d'échanges réguliers entre scientifiques et représentants d'organismes gouvernementaux nationaux et européens. Ils ont été menés annuellement au sein de groupes de travail sous l'égide du CIEM (www.ices.dk), l'IOC-UNESCO (ioc-unesco.org), Ospam (www.ospar.org) en Atlantique Nord-Est et avec le consortium CIESM (www.ciesm.org) en appui à la convention de Barcelone en Méditerranée. Ces développements méthodologiques (figure 2.24) ont été menés dans un objectif commun d'élaboration d'un programme de surveillance.

Ce dernier s'est construit dans un premier temps sur l'acquisition de connaissances dans chaque pays suivant des stratégies et des priorités différentes [HYL 17]. Il a reposé également sur des programmes d'études sur le terrain et des groupes de travail initiés par la commission océanographique intergouvernementale (IOC: Intergovernmental Oceanographic Commission) et le CIEM. Ces deux instances ont organisé en 1986 le GEEP (Group of the Experts on the Effect of Pollutant) à Frierfjord en Norvège [BAY 88] pour l'étude des effets biologiques en zone subarctique, puis aux Bermudes en 1988 [ADD 90] en zone subtropicale (figure 2.20).

Le groupe de travail Bremerhaven a ensuite été mené par le CIEM sur les sites du sud de la mer du Nord en 1990 [STE 92] afin de compléter l'approche sur des milieux contrastés (subarctique, subtropicale et mer du Nord). Cette période du début des années 1990 constitue une période pivot pour le lancement d'initiatives pionnières en écotoxicologie marine. Confortée, par la conférence des Nations Unies de Rio de Janeiro en 1992 et la dynamique européenne entre 1988 et 1990, la France a lancé ses premières actions de recherche avec le GICBEM en 1987, puis des études pilotes sur l'estuaire de la Seine [BUR 94a], [BUR 94b] et le site de Marseille et Golfe de Fos [BUR 96].


Un cheminement de recherche et de développements méthodologiques d'une vingtaine d'années a abouti en 2012 à la validation de méthodes de références pour les bioessais et les biomarqueurs en milieu marin et la détermination de seuils produits à partir de données acquises sur le terrain. Les pays de l'Atlantique Nord-Est ont élaboré des stratégies d'études différentes [HYL 17] mais en développant des biomarqueurs et bioessais communs. Des études à long terme ont été conduites pendant une vingtaine d'années en zone côtière et offshore

sur la mesure d'activités enzymatique EROD chez la perche en Suède [HAN 06]. D'autres études ont été réalisées des années 1985 à 2010 sur les pathologies de limandes et de flets en mer du Nord par les Pays bas, l'Angleterre et l'Allemagne [VET 17] , [LAN 17]. De multiples initiatives de suivis ponctuels ont été lancées en zones côtières sur la base de biomarqueurs enzymatiques, d'altérations cellulaires ou de dommages à l'ADN sur des moules et poissons en Norvège, Espagne, France, Italie, Islande, Écosse, Irlande, Belgique mais également en Allemagne, Hollande et Angleterre.

Figure 1.24 : *Etapes de développements méthodologiques des bioessais et biomarqueurs jusqu'à une application en surveillance OSPAR et DCSMM dans le cadre d'une approche intégrée de chimie et effets biologiques. (Lire en lien avec la figure 1.22 de structuration internationale de l'écotoxicologie)*

Dans le cadre d'un programme européen mené en mer du Nord (ICON : Integrated Assessment of Contaminants impacts on the North sea) dans le cadre de la convention marine Oskar, onze sites ont été sélectionnés pour une développer une étude sur une large échelle géographique en Atlantique Nord Est et Méditerranée entre 2008-2010. Six verrous scientifiques et techniques ont dû être levés pour aboutir à une approche intégrée de surveillance des zones côtières et offshore incluant un volet chimique et un volet écotoxicologique. Une démarche d'harmonisation entre les façades maritimes de l'Atlantique et la Méditerranée a permis d'adopter le principe d'une démarche intégrée de chimie et écotoxicologie.

Le premier verrou méthodologique était de sélectionner des biomarqueurs et bioessais pertinents pour une application en surveillance. La pertinence a été déterminée sur la base des mécanismes moléculaires, cellulaires ou tissulaires capables de révéler une exposition et des effets biologiques liés aux contaminants chimiques. Les effets devaient être mesurables sur des organismes prélevés dans leur habitat naturel. Ils devaient aussi révéler une exposition précoce ou à long terme, de l'individu aux populations. Le choix des biomarqueurs et bioessais résulte d'une expertise acquise directement dans le milieu naturel par les pays contractants de la convention Oskar. La cellule, comme premier niveau d'organisation biologique demeure une clé d'entrée pour l'évaluation des effets des contaminants chimiques et apporte un caractère spécifique quant aux mécanismes précoces qui sont directement ou indirectement perturbés. Les mécanismes biologiques les plus représentatifs de perturbations précoces ont été sélectionnés (Tableau 2.8) parmi les altérations neurotoxiques (AChE), les altérations de l'ADN (génotoxicité avec la mesure des micro-noyaux, du test comète, des adduits à l'ADN), le stress oxydant, le métabolisme de phase 1 (EROD, CYP450), la production de métabolites (métabolites d'HAP), l'altération de l'intégrité cellulaire (stabilité lysosomale), les effets à long terme ont été recherchés parmi les perturbations des grandes fonctions physiologiques comme la reproduction (Vtg, taille des gonades), la croissance (relation taille et âge), et les pathologies externes et internes. La fonction immunitaire et le stress oxydatif restent des mécanismes pertinents mais ils n'ont pour le moment pas fait consensus dans le cas des expertises acquises sur le terrain et restent des domaines de recherche en développement sur les espèces modèles (poisson ou les bivalves).

Tableau 1.8 : *Liste des biomarqueurs et bioessais mesurés par taxons pour évaluer différents effets biologiques et valeurs seuil de référence déterminées pour les biomarqueurs chez le poisson et la moule ainsi que pour des bioessais sur le sédiment et l'eau. 1b) Valeurs seuil de référence (BAC: Background Assessment Criteria et valeur seuil d'effet (EAC: Environmental Assessment Criteria) déterminées pour les biomarqueurs et bioessais (Davies & Vethaak, 2012). * Comet limande; **1OHpyrène cabillaud; *** EROD activity chez le mâle;  % prevalence in dab; ND: non déterminé*

Le second verrou était de développer des méthodologies analytiques robustes et fiables pour les biomarqueurs et bioessais les plus développés en Europe. L'application d'une rigueur équivalente aux développements méthodologiques déjà menés depuis trente-cinq ans en chimie par les groupes OSPAR était la première condition pour construire une démarche intégrée en chimie et écotoxicologie. La seconde condition était de sélectionner les méthodes d'analyses des biomarqueurs et bioessais éprouvées sur le terrain et dans le plus grands nombre de sites d'étude Européen en Atlantique Nord Est, mer Baltique et Méditerranée depuis plus de vingt ans.

Bien que la France ne soit pas directement impliquée dans la surveillance de la mer Baltique des échanges

étroits existent avec les pays contractants d'OSPAR ayant une façade en mer Baltique. Des bioessais et biomarqueurs déjà appliqués dans des programmes de recherche européens BIOMAR [GAR 01], BEEP [BRO 06] ou nationaux Seine Aval : [BUR 00] , [POI 11] , RNO [BUR 98] ont été évalués lors de programmes spécifiques menés sur le terrain à l'initiative d'OSPAR (GEEP [BRE 90] , BECPELAG [BEC 04], ICON [HYL 17]) et UNEP/MEDPOL/RAMOGÉ [UNE 99]. Une première liste (Tableau 2.7) de méthodologies analytiques des biomarqueurs et bioessais a ainsi été produite sur la base d'un consensus européen. Les critères de sélection étaient la répétabilité analytique, une variabilité naturelle acceptable, une applicabilité par le plus grand nombre de laboratoires, une faisabilité sur des petits échantillons tissulaires ou une quantité de cellules réduites pour une adaptation optimisée aux organismes modèles moules et poissons.

Le troisième verrou visait à mettre en place un programme d'assurance qualité respectant les mêmes exigences de qualité que le programme QUASIMEME pour la chimie [WEL 06]. L'acquisition de données en surveillance ne peut être mise en œuvre que sur la base de méthodes d'analyses éprouvées et validées dans le cas d'exercices d'intercomparaison entre laboratoires experts. Il fut d'autant plus facile de s'inspirer du programme QUASIMEME qu'un premier biomarqueur appelé « imposex » avait été soumis à une démarche d'assurance qualité QUASIMEME depuis 2003. Inspiré de QUASIMEME, le programme européen Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes (www.Bequalm.org) a été initié en 1998 pour assurer une excellence analytique dans chacun des laboratoires des pays contractants de la convention Oskar pour les méthodologies retenues. Des exercices d'intercalibrations ont ainsi été réalisés dans le but de valider les méthodes de référence rédigées par le CIEM et d'amener les compétences analytiques des pays contractants à un même niveau d'excellence [MAR 15]. La mise en œuvre de ce programme BEQUALM depuis 2005, démontre encore néanmoins, que l'assurance qualité n'est applicable de manière efficace que lorsque des programmes pérennes sont adoptés. Il est en effet très difficile pour les laboratoires et pour les organisateurs (laboratoires déclarés experts par le CIEM pour biomarqueurs et bioessais) du programme d'assurance qualité BEQUALM de planifier régulièrement des exercices d'intercalibrations pour des biomarqueurs et bioessais non obligatoires en surveillance. Dans une Europe à budgets contraints, les pays contractants privilégient les exercices obligatoires. Les initiatives d'intercalibrations pour des exercices menés avec des biomarqueurs candidats pour la surveillance non obligatoire sont très peu soutenues par les pays contractants. Cela pose ainsi un véritable problème de développement méthodologique pour l'insertion de nouveaux biomarqueurs. Le problème est identique pour l'insertion en surveillance de contaminants émergents.

Le quatrième verrou était de développer une interprétation standardisée des bioessais et biomarqueurs dans le cas d'une approche intégrée de chimie et d'écotoxicologie. Inspiré de l'évaluation du risque chimique, l'interprétation repose ainsi des valeurs seuils développées pour les contaminants chimiques pour des applications de surveillance dans la DCE et dans le programme CEMP d'OSPAR.

Ces valeurs seuils ont été déterminées pour treize biomarqueurs et bioessais (Tableau 2.6) ainsi que pour certains contaminants chimiques (Tableau 2.9). L'originalité de la démarche est que les seuils d'interprétation des biomarqueurs et bioessais ont été développés à partir de séries de données acquises dans le milieu naturel. Les espèces sentinelles de moules (*Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Mytilus trossulus*) et différentes espèces de poissons (flets, cabillaud, limande, rouget barbet de vase) ont été échantillonnées pendant plusieurs années et sur différents sites européens de l'Atlantique Nord-Est et en Méditerranée. L'échantillonnage mené sur une large échelle a permis de vérifier que l'amplitude de réponses mesurées pour chaque biomarqueur et bioessai était comparable du Nord au Sud de la zone considérée. Ce point particulier était une condition *sine qua non* pour une application de la démarche de standardisation sur une large échelle géographique. Ce résultat essentiel a permis une application des mêmes seuils de base et seuils d'effets pour une espèce modèle échantillonnée en Atlantique Nord-Est. Néanmoins, pour interpréter ces mêmes seuils appliqués sur une échelle Nord-Sud, il était nécessaire d'intégrer les variations saisonnières qui influent directement sur l'état physiologique et en particulier qui décalent le cycle de reproduction d'une même espèce entre le Nord et le Sud de l'Atlantique. Pour chaque espèce, des valeurs seuils de régulation physiologique normale ont été déterminées comme valeurs seuils de base (régulation homéostatique). Des limites supérieures pour les valeurs de biomarqueurs et bioessais ont également été déterminées comme seuils d'effets à partir de séries de données acquises à long terme dans des habitats contaminés et échantillonnés sur une large échelle géographique entre l'Islande au Nord et l'Espagne au Sud. Ce travail de développement méthodologique de seuils d'effets et de seuils de base (ou de référence) applicable sur une large échelle des côtes européennes pour des biomarqueurs et bioessais est unique. Il résulte d'un calcul de moyennes et percentiles pour chaque biomarqueur et bioessai obtenus par l'analyse de séries de données de terrain. La comparaison de nombreuses données collectées depuis vingt ans entre le Nord et Sud de l'Atlantique et à des périodes différentes a permis d'intégrer les variations spatio-temporelles. Les valeurs de biomarqueurs et bioessais obtenues sur des stations très exposées ou des stations peu exposées ont été utilisées pour le calcul respectif de seuils de base (en zones peu exposées) et seuils d'effets (en zones très exposées). Ce travail a été

conduit sous l'égide du CIEM dans le cadre de groupes de travail (WIKMON, SGIMC et le WGBEC) pendant cinq années. Le rapport de synthèse produit par ces groupes résulte d'un consensus et d'une expérience européenne acquise sur le terrain pendant près de vingt-cinq ans [DAV 12]. L'application de seuils spécifiques pour chaque biomarqueur, chaque bioessai et chaque contaminant chimique analysé permet d'agréger pour plusieurs espèces collectées par station, l'ensemble des valeurs pour le calcul d'une échelle de couleur restituant 1) un pourcentage de valeurs inférieures au seuil de base, 2) un pourcentage de valeurs entre le seuil de base et le seuil d'effet et enfin 3) un pourcentage supérieur au seuil d'effet. Les valeurs inférieures au seuil de base sont interprétées comme une situation d'homéostasie. Les valeurs entre le seuil de base et le seuil d'effet caractérisent un effort d'adaptation. Les valeurs supérieures au seuil d'effet caractérisent un stress susceptible de dépasser les capacités d'adaptation métaboliques et d'entraîner un épuisement physiologique provoquant des pathologies et/ou des mortalités.

Tableau 1.9: b) Valeurs seuils de référence déterminées pour les contaminants chimiques. (Davies & Vethaak, 2012) (BAC; Background Assessment Criteria; EAC: Environmental Assessment Criteria; ERL: Effect Range Low; EC:). Concentrations chimiques dans le sédiment (mg.kg^{-1} poids sec de métaux, $\mu\text{g.kg}^{-1}$ poids sec de contaminants organiques). BAC sédiment normalisé suivant 2,5% de carbone organique pour les HAP et 5% aluminium pour les métaux. ^{1 et 4} poids sec dans les muscles, ^{6 et 5} poids sec dans le foie

Le cinquième verrou portait sur la démonstration de l'applicabilité d'une démarche intégrée chimie et biologie en intégrant la concentration des contaminants, l'exposition et les effets sur une large échelle géographique (figure 2.23). Les études de cas sur des sites ateliers sélectionnés sur une large échelle géographique se sont révélées très pertinentes. 14 pays contractants de la convention OSPAR ont pris l'initiative de construire un projet en Atlantique Nord-Est en échantillonnant des stations entre l'Islande et l'Espagne. Le programme ICON a ainsi été initié entre 2008 et 2010 pour démontrer l'applicabilité d'une démarche intégrée à partir d'échantillons de sédiment, des moules (*Mytilus edulis* et *Mytilus gallorprovincialis*) et des poissons (flet, cabillaud, limande, Hareng en Atlantique et rouget barbet de vase en méditerranée). La même stratégie d'échantillonnage et les mêmes méthodes d'analyses référencées par le CIEM [DAV 12] ont été appliquées sur la base de recommandations guides pour la mesure des contaminants chimiques (cadmium, plomb, mercure, PCB, HAP) dans le sédiment et le biote, les biomarqueurs et les bioessais. Les résultats ont fait l'objet d'un numéro spécial regroupant la production de 14 articles publiés dans revue Marine Environmental Research. [HYL 17]. La méthode d'agrégation développée pour les contaminants chimiques et les effets biologiques peut être appliquée sur les matrices sédiment, et biote suivant une approche par sites ou par régions. Les articles produits mettent en évidence des initiatives stratégiques différentes par pays, des efforts socio-économiques différents, mais des variations de biomarqueurs et bioessais comparables parce que d'une part les méthodes d'analyses sont identiques et d'autre part parce que les espèces modèles ont des capacités de régulation physiologiques similaires malgré l'influence de facteurs environnementaux (temp, salinité...) et génétiques (moules hybrides). L'application d'une méthode d'interprétation intégrée suivant les mêmes méthodologies Oskar permet une comparaison spatiale. Parmi les résultats les plus significatifs, les concentrations chimiques de contaminants détectées sont inférieures aux seuils EAC dans les zones offshore exceptées autour de certaines plate-formes pétrolières comme EKOFISK et Firth of Forth (figure 2.25). En zone côtière, des concentrations de mercure et de plomb dépassent les EAC dans le Wadden sea et à Cartagena. Le mercure dépasse également les EAC dans la Baie de Seine. Des concentrations chimiques (PCB et HAP) inférieures aux EAC en Espagne et en Islande ont été quantifiées en relation avec des valeurs de biomarqueurs inférieures aux seuils EAC. Des valeurs élevées de la stabilité Lysosomale supérieures aux EAC sont cependant observées sur les sites de Firth of forth en Ecosse et en Wadden Sea en Hollande alors que les contaminants mesurés (PCB, HAP et Hg) sont à des concentrations inférieures au EAC. Des effets biologiques sont ainsi parfois observés sur des sites pour lesquels les contaminations chimiques mesurées sont inférieures aux EAC. Les poissons (flet hareng, limandes) collectés à Firth of Forth, en Islande et en Baie de Seine montrent des contaminations en PCB et métabolites HAP supérieures aux EAC.

Figure 1.25 : 14 sites étudiés en Atlantique Nord-Est et en Méditerranée suivant les deux matrices biote et sédiment . Couleurs: bleu :moule limande ; rouge : sédiment ; jaune : flet ; , vert :limande ; vert foncé : harreng ; violet : rouget barbet de vase (d'après [HYL 17])

L'expérience française menée dans la programme ICON sur le site de la baie de la Seine présentait l'originalité d'une étude locale menée sur plusieurs espèces de poissons (flet, limande), la moule, le gastéropode *Nucella lapillus* et le sédiment. Elle résulte d'une stratégie nationale de recherche qui était focalisée sur un site pilote très pollué en appliquant un large panel de biomarqueurs et bioessais. Les résultats obtenus montrent l'applicabilité de la méthode intégrée sur deux espèces de poissons, un bivalve, un gastéropode et du sédiment. Elle illustre également la stratégie française de développer un effort d'échantillonnage intégré sur un site pilote très contaminé et bénéficiant des données fournies depuis les années 1990 avec le projet Seine Aval [BUR 17,] (figure 2.26). Deux zones d'études ont été échantillonnées dans la baie de Seine. Le choix des deux zones a été réalisé à partir de la dispersion des courants de la Seine qui influence une diffusion des contaminants suivant un gradient de contamination décroissant de l'embouchure vers l'ouest de la Baie. L'application des seuils BAC et EAC a permis la mise en œuvre de l'approche intégrée chimie et biologie décrite par [DAV 012] et une comparaison des seuils chimiques et biologiques avec les autres sites de l'Atlantique Nord Est en en Méditerranée. L'embouchure de l'estuaire de la Seine apparaît parmi les sites les plus contaminés avec 70% des concentrations de contaminants chimiques supérieurs aux seuils et 45% des effets biologiques supérieurs au seuil EAC en 2008 et 2009. Le sédiment échantillonné dans l'embouchure a révélé 40% de toxicité supérieure au seuil EAC. Cette approche validée dans le cadre du projet européen ICON est aujourd'hui appliquée pour le descripteur 8 de la DCSMM dans le cadre du plan national de surveillance.

Figure 1.26 : Application de la méthode intégrée de chimie et biologie dans la baie de Seine pour les moules, le flet, la limande et un gastéropode (*Nucelle*). Les graphes représentent une agrégation des résultats obtenus avec l'analyse de biomarqueurs chez les organismes (moule, poisson, gastéropode) et l'analyse de bioessais sur le sédiment. Chaque graphe représente par station et pour les années 2008 et 2009, la classification des niveaux de contaminants, d'exposition et d'effets. La couleur rouge indique le % de valeurs supérieures au BAC, la couleur verte le % de valeurs entre le BAC et l'EAC et la couleur bleue le % de valeurs inférieures au BAC.

Le sixième verrou est d'ordre politique puisqu'il s'agit de convaincre aujourd'hui le plus grand nombre de politiques et de gestionnaires des différents pays contractants. L'objectif est de mettre en œuvre l'approche intégrée de chimie et biologie en surveillance de routine. En période de crise financière en Europe, l'approbation d'un programme ambitieux basé sur une approche écosystémique est confrontée à des contraintes économiques. Chaque pays a la responsabilité de déclinaison d'une évaluation du bon état écologique en surveillance. La diversité des stratégies politiques et scientifiques des pays contractants complexifie le processus de mise en œuvre d'une approche européenne consensuelle. La DCSMM adoptée en juin 2008 appelle les états membres de l'union européenne à prendre les mesures utiles à la réduction des impacts pour le maintien du bon état écologique du milieu marin d'ici 2020. Pour le descripteur 8 qui concerne les contaminants chimiques et les effets, le premier travail mené depuis vingt-cinq ans par les scientifiques était le développement et la validation scientifique de méthodes et d'outils de gestion sur la base d'un consensus Oskar [DAV 12]. Ce consensus Européen est important mais il est maintenant nécessaire que les pays contractants se donnent les moyens de l'appliquer sur un plan national. La voie développée par le ministère français de l'Environnement de l'Energie et de la Mer est de soutenir cette démarche intégrée de chimie et biologie au niveau des conventions des mers régionales OSPAR [OSP 16] en Atlantique Nord-Est et en Méditerranée (convention de Barcelone) ainsi qu'au niveau de la Commission Européenne pour une harmonisation de la surveillance par façades maritimes partagées avec les pays voisins.

1.2.5.2.1. Processus d'application de la méthode intégrée chimie et écotoxicologie en surveillance à l'échelle nationale: Lancement du plan de surveillance DCSMM

Après une première étape visant à évaluer l'état initial du milieu marin en 2012 dans le cadre de la DCSMM, le lancement du plan de surveillance pour chaque sous-région marine en 2016 concrétise au niveau national l'application de la méthode intégrée chimie et biologie dans le cadre réglementaire de la DCSMM et spécifiquement pour le descripteur 8 de la contamination chimique et des effets biologiques. Fondée sur l'arrêté français de 2012 [ARR 12], la surveillance a été initiée sur deux estuaires de la côte Manche-Atlantique, en estuaire de Loire et estuaire de Seine puis dans le delta du Rhône en Méditerranée. Le choix de trois sites de suivi couvre ainsi trois des quatre régions marines définies par la DCSMM: L'estuaire de Seine en Manche mer

du Nord, l'estuaire de la Loire dans le Golfe de Gascogne et le Delta du Rhône en Méditerranée occidentale. Ce plan de surveillance sera conduit de manière évolutive suivant des cycles de six ans qui permettront l'intégration de modifications correctives et de connaissances nouvelles pour évaluer les pressions et impacts des activités humaines.

1.2.5.3 Conclusion et perspectives

Le développement de la surveillance des effets biologiques des contaminants chimiques dans le milieu marin en France a été principalement guidé par une stratégie européenne suivant les conventions des mers régionales Oskar et de Barcelone. Comme les autres états membres de l'union européenne, la France a décliné les orientations européennes suivant des initiatives nationales à partir d'études de terrain. Des sites très contaminés comme l'estuaire de la Seine et le Delta du Rhône ont été plus particulièrement investies pour optimiser un effort de développement sur un large panel de biomarqueurs et bioessais analysés sur des organismes modèles tels que le poisson, la moule et les gastéropodes ou bien le sédiment. Convaincu de l'intérêt d'une approche écosystémique pour la surveillance du milieu marin, la France s'implique aujourd'hui dans le soutien d'une approche intégrée de chimie et biologie à l'intérieur des comités décisionnels Oskar (MIME et HASEC). L'expertise Oskar acquise depuis les années 1980 apparaît en effet comme un garant d'excellence scientifique et un levier essentiel pour l'enrichissement régulier de la surveillance DCSMM (figure 2.25).

La construction évolutive des programmes de surveillance de la DCSMM comme de la DCE permettra de tendre vers une harmonisation de la surveillance notamment dans la zone de recouvrement de compétence des deux directives qu'est la zone littorale. Sur un plan technique, le développement de nouveaux seuils acquis à partir de données de terrain pour les contaminants chimiques émergents et pour les nouveaux biomarqueurs et bioessais sera un premier enjeu pour optimiser le diagnostic futur du bon état écologique. Le second enjeu sera d'apporter aux décideurs de nouveaux outils utiles à la prise de mesures de gestion pour réduire l'impact et la pression chimique. Pour cela, la combinaison d'une approche prédictive du risque chimique (basée sur des mesures d'exposition à partir de concentrations chimiques et bioessais) et avec une approche diagnostic basée sur la surveillance de terrain, devrait permettre de mieux discerner les classes de contaminants responsables d'effets biologiques. Le développement de méthodes d'analyses chimiques orientées par les effets (EDA : Effect Directed Analysis) combinés à l'usage de nouveaux outils comme les échantillonneurs passifs permettra de mieux cibler les contaminants susceptibles de provoquer des effets toxiques [BRA 14]. Enfin, il apparaît aujourd'hui irréaliste de mesurer les quelques 140 000 xénobiotiques présents dans l'environnement auxquels s'ajoutent les métabolites issus de leurs biotransformation ou de leur dégradation. Un effort de priorisation de substances à surveiller est nécessaire pour sélectionner les substances chimiques dangereuses pour l'écosystème marin. La sélection d'une liste de substances ciblées en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, leur toxicité et leurs usages permettra une surveillance objective et applicable.

1.2.6. Mammifères et oiseaux marins, indicateurs de la contamination du milieu

1.2.6.1. Introduction

Les organismes bioindicateurs ont montré tout leur intérêt pour évaluer et comprendre la contamination des écosystèmes aquatiques. Ces organismes reflètent en effet la contamination des chaînes alimentaires dont ils dépendent et permettent ainsi un suivi des concentrations des contaminants dans le milieu, ainsi que des variations de ces concentrations dans le temps et dans l'espace. De tels suivis apportent par ailleurs des informations quant aux niveaux de contamination chimique de base et permettent d'identifier les points chauds ou « hotspots » de la contamination. Ces informations sont essentielles pour prendre des mesures adaptées et ciblées visant à réguler et réduire les sources des contaminants. Ainsi, les programmes de suivi à long terme se sont progressivement développés dans les pays industrialisés à partir du début des années 80. En milieu marin par exemple, le Mussel Watch aux Etats-Unis ou le RNO (Réseau National d'Observation) en France, devenu ensuite le ROCCH (Réseau d'Observation de la Contamination Chimique), tous deux utilisant les mollusques bivalves comme organismes de suivi, sont parmi les plus anciens réseaux mis en place.

Même si la majorité des programmes de suivi en milieu marin utilise des invertébrés pour des raisons pratiques

évidentes (sédentarité, abondance, facilité de collecte, lien direct entre concentrations dans l'organisme et concentrations dans le milieu, ...), les prédateurs supérieurs, que ce soient les mammifères ou les oiseaux marins, sont également utilisés comme bioindicateurs de la contamination environnementale, notamment en zone polaire, dans le cadre de l'Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP) du Conseil de l'Arctique ou dans la région des grands lacs (Minnesota Loon Monitoring Program). Ces réseaux ont montré la pertinence de l'utilisation de ces prédateurs supérieurs comme bioindicateurs (les avantages sont expliqués ci-après) et leur suivi a fait l'objet de nombreuses études scientifiques un peu partout dans le monde. Les mammifères et les oiseaux marins offrent en effet de nombreux avantages quant à leur relative facilité d'observation et d'échantillonnage (du fait par exemple, pour les oiseaux ou les pinnipèdes, qu'ils forment de larges colonies de reproduction à terre où ils restent plusieurs mois par an, et sont donc accessibles), à la diversité de leur écologie trophique (permettant des études multi-habitats), à leur large distribution spatiale (permettant des études aux échelles régionales et globales) ou encore pour leur capacité à refléter la contamination de leur environnement. Leur utilisation systématique comme bioindicateurs peut malgré tout être vue comme particulière au regard des critères énoncés ci-dessus et en ce sens, certaines précautions doivent être prises, des études parallèles étant par exemple souvent nécessaires pour définir leur écologie trophique ou leurs déplacements dans l'espace. De plus, leur physiologie étant plus complexe que celle des invertébrés, ils peuvent donc métaboliser les polluants organiques (en raison d'un équipement enzymatique plus évolué) ou réguler les éléments traces métalliques (en raison de systèmes de détoxification plus aboutis) plus efficacement. L'effet des processus de métabolisation et de détoxification doivent donc nécessairement être pris en compte lorsque les mammifères et les oiseaux marins sont utilisés. Néanmoins, et en dépit de leur intérêt pour le suivi de la contamination chimique environnementale, l'utilisation systématique des mammifères et des oiseaux marins comme bioindicateurs n'a pas été privilégiée en France pour des raisons pratiques (absence de réseaux de collecte suffisamment structurés, difficultés d'interprétation des données, etc.) ou politiques (fragmentation de la gestion des réserves le long du littoral français, multiples interlocuteurs, absence de volonté politique).

Suite à l'adoption de la directive 2008/56/CE du Parlement Européen et du Conseil de l'Union Européenne du 17 juin 2008 appelée « Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin » (DCSMM), la France a établi un Plan d'Action pour le Milieu Marin (PAMM). Ce programme de surveillance, relatif au bon état écologique du milieu marin, comprend l'évaluation des niveaux des contaminants dans les organismes marins et l'évaluation de leurs effets chroniques et aigus sur ces organismes, en particulier sur les oiseaux marins (Descripteur 8 de la DCSMM). Dans ce contexte, et du fait de l'intérêt d'utiliser les prédateurs supérieurs comme indicateurs de la contamination du milieu, les mammifères marins feront l'objet d'une analyse des différents contaminants organiques et métalliques dans leurs tissus à l'échelle nationale en s'appuyant sur le Réseau National d'Echouage des mammifères marins coordonné par l'Observatoire PELAGIS (UMS 3462 du CNRS et de l'Université de La Rochelle). Ce réseau permet de récolter des échantillons le long des différentes façades maritimes de la France métropolitaine. Un tel réseau coordonné de collecte des oiseaux échoués n'existe pas à l'échelle nationale en France, même si l'Agence des Aires Marines Protégées (aujourd'hui partie intégrante de l'Agence Française pour la Biodiversité) a lancé en 2014 une initiative visant à structurer un Réseau Oiseaux Marins (RESOM) dans le cadre de la DCSMM (Descripteur 8) et de la convention OSPAR (Ecological Quality Objectives ou EcoQO). Le RESOM s'appuie sur le Groupement d'Intérêt Scientifique Oiseaux Marins (GISOM) et vise notamment à utiliser ces derniers comme des indicateurs de la qualité du milieu. Actuellement, les contaminants chimiques ne sont néanmoins pas dosés directement dans les tissus des oiseaux marins qui sont des espèces protégées et ne peuvent être abattus pour cela. Les cadavres récoltés pourraient sans doute être utilisés pour le suivi de la contamination si tant est que l'on puisse déterminer l'origine des oiseaux et que la raison de leur mort n'impacte pas les valeurs des concentrations mesurées. Quoiqu'il en soit, les oiseaux marins font l'objet de deux suivis OSPAR organisé en France : le programme (?) EcoQO Fulmar-Litter qui quantifie les particules de matière plastique dans l'estomac du fulmar boréal (*Fulmarus glacialis*) trouvés échoués et le programme EcoQO Oiled-Guillemots qui établit la proportion des guillemots mazoutés ; ces deux initiatives étant limitées à la Manche Est (Normandie, Picardie, Pas-de Calais, Nord). Même si ces différents programmes et réseaux (EcoQO, RNE) recensent les mortalités ou permettent l'analyse des contaminants dans les tissus des individus retrouvés échoués (avec de nombreux biais liés à la qualité de l'échantillonnage [FOR 15], ils ne permettent pas d'évaluer les effets chroniques et aigus des contaminants chimiques, principalement en raison de la qualité des échantillons qui n'autorise pas la réalisation d'analyses biochimiques ou histologiques. Des prélèvements sur des animaux vivants (biopsies, prises de sang) tels qu'ils se pratiquent déjà dans d'autres pays d'Europe, comme l'Allemagne ou la Norvège pourront permettre de mettre en œuvre dans le futur de telles investigations concernant les effets aux niveaux individuels et populationnels.

1.2.6.2 Caractéristiques des mammifères et oiseaux marins comme indicateurs de la contamination du milieu

Leur longévité et leur position trophique font des mammifères et des oiseaux marins des intégrateurs de la contamination environnementale [FUR 97] , [MÖS 97]. En effet, ces organismes longévifs sont soumis au processus de bioaccumulation tout au long de leur vie et sont donc susceptibles d'accumuler des contaminants durant plusieurs décennies. Leur position trophique, souvent terminale ou proche de l'apex (figure 2.27), fait quant à elle que mammifères et oiseaux marins sont fortement soumis au processus de bioamplification de certains contaminants dits bioamplifiables, c'est-à-dire ceux dont la concentration augmente à chaque niveau trophique le long de la chaîne alimentaire. En effet, l'alimentation constitue la principale voie d'exposition de ces organismes aux contaminants [AGU 99].

Figure 1.27 : Représentation d'un réseau trophique marin. Les oiseaux et mammifères marins se situent au sommet de la chaîne alimentaire ainsi que l'Homme par son action de pêche.

1.2.6.2.1. Capacité de bioaccumulation

Le premier critère permettant de retenir une espèce comme bioindicatrice de la contamination chimique est le fait qu'elle bioaccumule les contaminants, de telle sorte qu'elle intègre la contamination et qu'elle retienne dans le temps cette information « chimique » dans ses tissus. Idéalement, les concentrations environnementales et les mesures dans les tissus de l'espèce bioindicatrice doivent être liées par une relation simple de proportionnalité directe. Chez les mammifères et les oiseaux marins, une telle relation de proportionnalité est vérifiée pour les contaminants bioamplifiables comme le mercure ou les Polluants Organiques Persistants (POPs) tels que les PCB ou PBDE qui sont transférés le long des chaînes alimentaires et dont les concentrations augmentent à chaque niveau trophique. A ceux-ci s'ajoutent les contaminants qui se concentrent spécifiquement dans certains organes des vertébrés supérieurs. C'est le cas par exemple du cadmium dont l'organe de stockage principal est le rein. Ainsi, le cadmium est un indicateur de la consommation de proies particulières qui ont la capacité de concentrer ce métal à des niveaux élevés, comme les céphalopodes ou les amphipodes pélagiques du genre *Themisto* [BUS 98] , [LAH 15] [RIT 97]. C'est également le cas du sélénium qui se concentre fortement dans le foie du fait de la coprécipitation de celui-ci avec le mercure pour former des granules de tiémanite [CUV 91].

Bien que les concentrations de ces contaminants mesurées dans les tissus des mammifères et des oiseaux marins soient sous l'influence de plusieurs processus biologiques et écologiques [ROS 00], un nombre croissant d'études ont montré dans les dernières décennies l'utilité de ces prédateurs pour révéler leur présence et leur persistance dans les écosystèmes marins [HOE 03]. Ainsi, même les environnements les plus reculés, longtemps estimés préservés de toutes pollutions, ont été reconnus comme fortement contaminés il y a plusieurs décennies suite à l'analyse de POPs comme les polychlorobiphényles (PCBs) et les pesticides organochlorés dans le lard du léopard de mer (*Hydrurga leptonyx*) ou dans les œufs de différentes espèces de manchots [RIS 76]. Au contraire des POPs et du mercure, les éléments traces subissant une bioréduction dans les réseaux trophiques comme le cobalt, le chrome ou le nickel sont quant à eux mal révélés par ces vertébrés même dans les situations où le milieu marin est largement contaminé par ceux-ci. C'est par exemple le cas en Nouvelle-Calédonie où quel que soit le tissu analysé chez le cachalot pygmée (*Kogia breviceps*) ou le globicéphale tropical (*Globicephala macrorhynchus*), les concentrations de ces trois éléments restent inférieures à 40 ppb [BUS 03] alors qu'elles peuvent atteindre des concentrations supérieures de plusieurs dizaines de ppm chez les bivalves de cette zone [HED 09]. De même, la contamination du milieu par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) est théoriquement mal révélée par les prédateurs supérieurs car ils sont soumis aux processus de métabolisation qui les dégradent à chaque niveau trophique [BRO 90]. En ce sens, les mammifères et les oiseaux marins montrent une certaine limite quant à la bioindication de nombreux éléments traces et des HAPs. Soit les éléments traces métalliques ne sont pas ou peu transférés dans les réseaux trophiques, soit les HAPs sont métabolisés à chaque niveau trophique

Cependant, des travaux récents chez le plongeon imbrin (*Gavia immer*) aux Etats-Unis et chez les goélands marin (*Larus marinus*), brun (*L. fuscus*) et argenté (*L. argentatus*) de l'estuaire de la Seine ont montré des concentrations relativement importantes des HAPs légers mesurées dans le sang. Ces résultats indiquent que les oiseaux peuvent être soumis directement à ces contaminants, par la voie respiratoire notamment (projet GIP Seine-Aval Ecotones, données non publiées), [PAR 16] et suggèrent également que les métabolites des HAPs doivent être examinés même chez ces espèces de haut niveau trophique.

1.2.6.1.2. Une mobilité intrinsèque et une large distribution spatiale

Comme second critère de choix d'un organisme pour le suivi de la contamination chimique environnementale, la sédentarité est souvent mise en avant pour faire le lien entre lieu de prélèvement et contamination. Les mammifères et les oiseaux marins sont intrinsèquement mobiles avec des zones de vie pouvant être fortement variables suivant la saison considérée. Ils sont, pour la plupart, des organismes migrateurs qui occupent au cours de l'année des régions différentes parfois éloignées de plusieurs milliers de kilomètres [HAR 12] pour le phoque annelé *Pusa hispida* ou [GON 07] pour le puffin cendré *Calonectris diomedea*). Leur utilisation comme bioindicateur pourrait ainsi être vue comme problématique, mais cette mobilité présente aussi certains avantages. En effet, en comparaison des espèces fixées ou sédentaires qui reflètent une zone d'exposition précise, les mammifères et les oiseaux marins migrateurs intègrent de fait les contaminants sur différentes zones : leur zone de reproduction et leur zone d'hivernage. Cette caractéristique nécessite néanmoins de pouvoir discriminer les contaminants accumulés dans chacune de ces zones. Ainsi, il est nécessaire d'entreprendre en parallèle des mesures des contaminants, des études d'écologie spatiale (via l'utilisation du biologging et d'enregistreurs miniaturisés embarqués) afin de suivre les déplacements et déterminer la distribution des organismes au cours de leur cycle biologique. Cela nécessite également de bien choisir le tissu échantillonné afin que celui-ci reflète l'exposition de l'organisme aux contaminants durant la période, et donc sur la zone souhaitée (voir ci-dessous pour plus de détails).

Par ailleurs, les mammifères et oiseaux marins occupent toutes les différentes régions du globe des pôles aux tropiques. Les espaces marins sont partagés à la fois entre les espèces – avec certaines comme le manchot adélie (*Pygoscelis adeliae*), le mergule nain (*Alle alle*) ou le phoque de Weddell (*Leptonychotes weddellii*) présents exclusivement aux pôles alors que d'autres comme la frégate superbe (*Fregata magnificens*) ou la sterne fuligineuse (*Onychoprion fuscatus*) sont cantonnées aux régions tropicales – mais aussi au sein même des espèces. Par exemple différentes populations de mammifères marins tels que les phoques veaux marins (*Phoca vitulina*) ou les orques (*Orcinus orca*) se répartissent tout autour de l'hémisphère nord, depuis les côtes canadiennes, européennes ou russes. Ainsi l'étude de différentes espèces ou de plusieurs populations d'espèces ciblées réparties sur différentes régions du globe au cours des périodes de reproduction et/ou d'hivernage permet d'obtenir des informations sur la contamination du milieu à très large échelle spatiale [BRA 05] utilisant les oiseaux marins à l'échelle de l'Arctique Canadien, [SAV 13] , [SAV 14] , [SAV 15] étudiant le grand cachalot *Physeter macrocephalus* à l'échelle de l'Océan Mondial). Combinées à un suivi dans le temps, de telles approches spatiales permettent par ailleurs d'appréhender l'influence de processus globaux tels que le réchauffement climatique sur la contamination des écosystèmes marins [DIE 09] , [RIG10].

1.2.6.1.3. Des écologies trophiques contrastées

Les différentes espèces de mammifères et d'oiseaux marins s'alimentent sur une large gamme d'habitats, depuis les zones littorales jusqu'au milieu océanique (e.g. benthique, pélagique, épontique), et ce sur l'ensemble du globe. Ces caractéristiques permettent l'utilisation de niches écologiques contrastées ainsi que le partage des ressources entre espèces, limitant ainsi la compétition interspécifique lorsque ces prédateurs se retrouvent au sein d'un même site. C'est par exemple le cas des dauphins ou des marsouins qui s'alimentent en surface en opposition des grands plongeurs comme les baleines à bec et les cachalots qui plongent à de grandes profondeurs pour capturer leurs proies. Ainsi, l'étude de groupes d'espèces d'une même région mais présentant des écologies alimentaires contrastées permet de refléter la contamination de différents habitats et donc d'obtenir une information de la contamination d'un écosystème dans son ensemble [OCH 02] , [CAR 14]. Dans ces exemples, les prédateurs capturant leurs proies en profondeur se révèlent nettement plus exposés au mercure que les prédateurs de surface car les habitats mésopélagiques offrent des conditions favorables à la méthylation du

mercure qui se bioaccumule à des niveaux largement supérieurs de ceux des organismes épipélagiques [MON 96] , [CHO 12]. Dans le cadre de la DCSMM, il apparaît donc important de développer l'échantillonnage de tels prédateurs pour le suivi écosystémique des contaminants, pour, par exemple, obtenir de nouvelles informations sur la contamination des réseaux trophiques mésopélagiques.

Ces études multi-spécifiques nécessitent cependant d'une part une bonne connaissance de l'écologie des espèces afin d'identifier les habitats utilisés par les individus échantillonnés. Cela est possible par l'utilisation de traceurs chimiques comme les isotopes stables du carbone par exemple, ou par l'utilisation du biologing et de capteurs miniaturisés comme des GPS ou des enregistreurs de pression (TDR) permettant de déterminer les zones d'alimentation des individus et leur profondeur dans la colonne d'eau. D'autre part, des espèces qui occupent différents habitats ont également souvent des régimes alimentaires différents, constitués de proies aux positions trophiques variables, modifiant alors l'exposition de chaque espèce prédatrice aux contaminants. Une utilisation des espèces de mammifères et d'oiseaux marins comme bioindicateurs de la contamination d'un écosystème implique donc également une bonne connaissance de leur écologie alimentaire qui permettra de prendre en compte cette variabilité de leur position trophique et d'interpréter les variations interspécifiques mesurées. Il est pour cela nécessaire d'entreprendre en parallèle des mesures des contaminants, des études d'écologie trophique, au travers par exemple de traceurs chimiques comme les acides gras ou les isotopes stables de l'azote. Une telle approche conduite avec les isotopes stables sur les populations de goéland marin (*Larus marinus*), de goéland brun (*L. fuscus*) et de goéland argenté (*L. argentatus*) de l'estuaire de la Seine a révélé que les concentrations contrastées de certains contaminants sont dues à la zone d'alimentation. Ainsi, le goéland marin qui se nourrit en mer présente des concentrations plus élevées en mercure que les autres espèces. Les goélands argentés, qui ont une alimentation urbaine, ont quant à eux des concentrations plus fortes de plomb et de HAPs, et ils présentent des dommages (peroxydation lipidique) plus importants (projet GIP Seine-Aval Ecotones, données non publiées).

1.2.6.1.4. Quels tissus privilégier ?

Durant la période de reproduction qui les obligent à venir régulièrement à terre pour couvrir ou mettre bas, les oiseaux ainsi que certains mammifères marins (pinnipèdes) présentent l'avantage d'être relativement faciles à observer, à capturer et donc à échantillonner, tout du moins en comparaison de la très grande majorité des organismes marins planctoniques ou nectoniques dont le suivi requiert des campagnes en mer souvent logistiquement compliquées et coûteuses. En particulier, les oiseaux marins passent chaque année plusieurs semaines à plusieurs mois au sein de colonies pouvant regrouper des centaines de milliers d'individus pour la reproduction. C'est également le cas, dans une moindre mesure, de certains mammifères marins comme les morses (*Odobenus rosmarus*), les phoques, les otaries à fourrures ou encore les éléphants de mer (*Mirounga* sp.). Pendant cette période, il devient donc possible de suivre les individus et de les capturer afin de prélever des tissus qui permettront d'évaluer leur niveau de contamination. C'est également au cours de cette période que sont posés sur les individus des enregistreurs miniaturisés permettant de suivre par exemple leurs mouvements et leur comportement en mer. Les oiseaux marins présentent également la caractéristique d'être fidèles à leur site de reproduction, ce qui permet la capture et la recapture des mêmes individus au cours du temps, et donc un suivi à long terme de l'exposition aux contaminants d'individus ciblés et connus, pour lesquels d'autres informations biologiques peuvent être mesurées et enregistrées. Quoiqu'il en soit, et comme mentionné précédemment, le choix du tissu pour les analyses de contaminants est fondamental pour interpréter le niveau de la contamination chimique environnementale.

1.2.6.1.5. Utilisation de prélèvements lésaux

Historiquement, les tissus internes ont été privilégiés pour la mesure des contaminants chimiques étant donné qu'ils présentent des concentrations particulièrement élevées dans les organes de stockage. Ainsi, les tissus et organes suivants ont été analysés : le foie pour les POPs, le cadmium, le cuivre, le fer, le mercure et le plomb ; les reins pour le cadmium et le mercure ; le tissu adipeux pour les POPs ; les os pour le plomb. Si anciennement des animaux ont été abattus pour la mesure des contaminants chimiques dans leurs tissus, de telles pratiques sont depuis longtemps proscrites ou sujettes à une réglementation éthique drastique vu le statut d'espèces protégées de la très large majorité d'entre elles et la législation en vigueur aujourd'hui. De ce fait, l'utilisation des tissus

internes est largement restreinte à des animaux trouvés morts, échoués ou victimes d'accidents (collision avec les infrastructures humaines telles que les phares, les bateaux, les éoliennes, victimes de marées noires...) ou sur des animaux capturés involontairement lors des opérations de pêche (e.g., palangriers pour les oiseaux, chaluts pélagiques ou sennes pour les mammifères marins). Il existe également des opérations de captures pour la consommation des populations humaines locales dans un nombre limité de pays comme le Groenland, le Canada, les Iles Féroé, l'Islande, l'Alaska, la Russie et quelques localités au travers le monde où la chasse traditionnelle reste un moyen de subsistance. Une collaboration étroite entre chasseurs et scientifiques permet alors d'obtenir des échantillons de tissus de ces organismes chassés sans impact supplémentaire. Citons enfin la « chasse à la baleine » réalisée par la Norvège et le Japon sous le prétexte d'études scientifiques.

Dans le cas des captures accidentelles ou volontaires, les animaux sont réputés en bonne santé et représentatifs de la population. Dans un certain nombre de cas, il convient néanmoins de pondérer cette affirmation. Chez les mammifères marins sociaux comme les delphinidés, les captures accidentelles dans les chaluts pélagiques frappent plus particulièrement un segment précis de la population, les individus immatures, peu expérimentés alors que les adultes plus âgés se montrent plus prudents grâce à leur expérience et ils sont ainsi plus enclins à éviter la capture dans les engins de pêche [NOR 99]. A l'inverse, chez les oiseaux marins, ce sont les adultes, mais aussi les mâles, qui sont les plus touchés par les captures accidentelles, certainement en raison de la ségrégation spatiale qu'il existe entre classes d'âge et entre sexes, entraînant des interactions plus fréquentes des adultes mâles avec les bateaux de pêche [GIA 17].

Dans le cas des animaux échoués, une analyse de la condition corporelle est un préalable à l'utilisation des tissus internes. En effet, si bon nombre des animaux trouvés échoués ont été victimes d'une interaction létale avec les activités humaines (pêche, collision, prospection pétrolière, manœuvres militaires...), certains individus sont morts d'autres causes (maladies, parasitoses, malnutrition, épuisement, marée noire...) qui peuvent avoir une incidence forte sur la concentration des contaminants dans les tissus de stockage voire sur leur composition. Cela est dû aux processus de remobilisation des contaminants chimiques des tissus de réserve (gras, muscles, foie) lors de la période de jeûne précédant la mort pendant laquelle les animaux, trop faibles ou malades, cessent de s'alimenter. L'analyse des causes de la mort (e.g., marques de capture, autopsie) et de la condition corporelle, permet de discriminer les individus représentatifs de la population en bonne santé des individus dénutris dont les concentrations en contaminants chimiques sont à considérer avec recul. Par exemple chez les mammifères marins, [DEH 05] ont montré chez les phoques annelés (*Pusa hispida*) que les individus atteints de maladies et de parasitoses présentaient systématiquement une proportion de méthylmercure dans le foie supérieure à celles des individus sains. Ainsi, la détermination des seuils au-delà desquels des dysfonctionnements ou des pathologies apparaissent reste aujourd'hui un verrou à lever pour les mammifères et les oiseaux marins, notamment parce qu'il est difficile, voire impossible de réaliser les expérimentations nécessaires pour les déterminer. Des approches statistiques et épidémiologiques sont entreprises même si elles présentent certaines limites, notamment pour prendre en compte les effets conjugués ou antagonistes des différents POPs toxiques ou facteurs confondants. Quoiqu'il en soit, sur les côtes françaises et européennes, les niveaux de PCBs excèdent fréquemment le seuil déterminé par [KAN 00] (i.e. 17 µg de PCB par gramme de lipides dans le foie) au-delà duquel des effets sur la reproduction sont observés chez les mammifères aquatiques [PIE 08]. En effet, ce seuil est dépassé pour 47% des marsouins communs (*Phocoena phocoena*) et 40% des dauphins communs (*Delphinus delphis*) de l'étude (figure 2.28), en particulier pour 74% des marsouins du sud de la Mer du Nord et 50% des dauphins communs des eaux côtières françaises. Cette étude de l'impact des POPs sur ces petits cétacés a également permis de faire le lien entre contamination et pathologies, avec des concentrations de POPs systématiquement plus élevées pour les marsouins morts de maladie ou de parasitoses que ceux morts d'autres causes [PIE 08]. Des pathologies associées aux fortes concentrations de POPs apparaissent en raison de l'effet immunotoxique des POPs chez les mammifères marins qui augmentent les risques d'infection [HAL 06]. Dès lors, un suivi des paramètres immunitaires en relation avec les concentrations de POPs permet d'évaluer le risque pour ces populations de prédateurs supérieurs.

Figure 1.28 : Localisation des échantillonnages pour (a) le marsouin commun (*Phocoena phocoena*) et (b) le dauphin commun (*Delphinus delphis*). Les cercles rouges indiquent l'emplacement des animaux échoués et les triangles jaunes les femelles échantillonnées pour l'analyse des POPs dans le lard [PIE 08].

Chez les oiseaux, [FOR 15] ont montré une augmentation d'un facteur 2 des concentrations de mercure dans le

foie, les reins, les muscles et le sang des pingouins torda (*Alca torda*) échoués sur les côtes françaises en comparaison d'individus sains capturés accidentellement. Malgré ces biais, l'analyse de tissus provenant de cadavres est essentielle pour établir le lien avec les prélèvements non létaux (cf. paragraphe suivant) en amont des programmes d'échantillonnage visant à suivre l'état de la contamination, pour valider la représentativité de ces tissus par rapport aux organes internes.

Par ailleurs, une des limites majeures de l'utilisation des tissus internes est la connaissance de l'âge des individus. En effet, les contaminants métalliques bioaccumulables comme le mercure ou le cadmium montrent une augmentation continue avec l'âge dans le foie et les reins des mammifères et des oiseaux marins. Des travaux concernant le mercure chez le dauphin bleu et blanc (*Stenella coeruleolba*) sur la base de la taille et non de l'âge des dauphins avaient conclu à la plus forte contamination des individus provenant de Méditerranée que ceux du Golfe de Gascogne [AND 91] alors qu'en tenant compte de l'âge, [LAH 06] ont montré qu'il n'y a pas de différence entre ces deux populations. Il en est de même des POPs dans le lard et la graisse. L'âge des individus peut être déterminé relativement facilement chez les odontocètes et les pinnipèdes, mammifères marins à dents, par la lecture des marques annuelles de dépôt de dentine dans les dents (odontochronologie). La détermination de l'âge s'avère beaucoup plus compliquée chez les mysticètes et les oiseaux marins. En effet, une telle lecture dans les tissus osseux (squeletteochronologie) en l'absence de dents n'est pas possible du fait de la destruction des marques de croissance par des remaniements tissulaires fréquents [CAS 92]. On notera également que le statut reproducteur des femelles influence les niveaux de concentrations des POPs dans leurs tissus internes étant donné qu'ils sont remobilisés de manière importante lors de la gestation et de l'allaitement du petit [ADD 87], [DES 12]. Pour les contaminants transférés par la gestation et l'allaitement, il convient donc de privilégier l'utilisation des individus mâles dans les programmes de suivi.

1.2.6.1.6 Utilisation de prélèvements non létaux

L'utilisation de prélèvements non létaux sur des animaux sauvages se développe de plus en plus pour répondre aux exigences scientifiques d'obtenir des informations robustes sur les populations saines tout en respectant la réglementation éthique. Ces prélèvements non létaux sur des espèces protégées permettent en outre le suivi temporel de la contamination à l'échelle individuelle et de montrer les effets démographiques (impact sur la reproduction et la survie) dans la mesure où les mêmes individus peuvent être échantillonnés successivement sur le long terme. L'utilisation de tels prélèvements constitue donc un enjeu majeur pour la mise en place de suivis de long terme et pour l'établissement de valeurs seuils nécessaires pour faire évoluer la réglementation dans l'avenir.

Comme nous l'avons précisé précédemment, chez les mammifères marins, les possibilités de capture-relâché se limitent essentiellement aux pinnipèdes : phoques, éléphants de mer, otaries à fourrure, lions de mer, et morses, ainsi qu'aux ours polaires (*Ursus maritimus*). Dès lors, il est possible de réaliser une prise de sang et de collecter des poils pour l'analyse des contaminants sur ces espèces. Chez les cétacés, la capture-relâché n'étant pas réaliste, les prélèvements non létaux consistent en la réalisation de biopsies par le tir d'une flèche munie d'un emporte-pièce de petite taille. Les biopsies permettent l'obtention d'un échantillon de peau et du lard sous-jacent. Cette technique à l'origine mise au point pour les études de génétique s'est progressivement étendue aux études d'écologie trophique et comportementale. Celles-ci ne nécessitent en effet que de très petites quantités de tissu pour l'analyse des traceurs chimiques tels que les isotopes stables du carbone et de l'azote dans la peau [NEW 10] ou le profil des acides gras dans le lard [IVE 04]. En ce qui concerne les contaminants, il est également possible de les analyser dans la peau (éléments traces métalliques) et le lard (POPs). Cette approche se heurte cependant à deux limites : une limite analytique car la taille des biopsies chez les petites espèces (e.g., les Delphinidés) limite le nombre d'éléments traces et de composés organiques quantifiables de manière fiable ; et une limite méthodologique qui concerne le lien entre la mesure des métaux dans la peau et la correspondance avec les tissus de stockage des métaux (foie et reins). Ainsi, parmi 14 éléments traces métalliques analysés chez trois espèces de dauphins : le grand dauphin (*Tursiops truncatus*), le dauphin commun (*Delphinus delphis*) et le dauphin bleu et blanc (*Stenella coeruleolba*) et une espèce de marsouin, le marsouin commun (*Phocoena phocoena*) des côtes françaises par [AUB 13]), seuls six étaient au-dessus de la limite de détection et ont donc pu être quantifiés avec précision, et seul le mercure a montré un lien entre la concentration dans la peau et dans le lard avec celles des tissus internes.

Durant la période de reproduction des oiseaux marins, au cours de laquelle ces organismes se retrouvent à terre

pour élever leur(s) progéniture(s), il est de la même manière possible de collecter des échantillons de plumes et de sang sur des individus adultes ou sur les poussins. Comme pour les mammifères marins, le sang, après centrifugation, permet pour un même échantillon une analyse des éléments traces qui sont principalement associés aux cellules sanguines et une analyse des POPs qui sont majoritairement liés à la fraction plasmatique. Ces analyses sanguines renseignent sur l'exposition récente de l'individu dans le cas des contaminants stockés de manière dynamique dans les tissus de stockage. Les plumes, tout comme les poils, apportent quant à elles une information temporelle différente. En effet, la synthèse des plumes lors des séquences de mue représente chez les oiseaux marins une voie majeure d'excrétion de certains contaminants qui sont remobilisés depuis les tissus de stockage au moment de la mue, comme le mercure. Ainsi, au moment d'une séquence de mue, environ 80% du mercure contenu dans les tissus internes est excrété dans les plumes [BRA 87] , [HON 86] , [AGU 05]. Une fois les plumes synthétisées, les concentrations d'éléments trace qu'elles contiennent ne varient plus. Il est donc clairement établi que les concentrations de mercure mesurées dans des plumes reflètent le mercure accumulé par l'oiseau au cours d'une période qui s'étend de la séquence de mue produisant ces plumes à la séquence de mue précédente. Ainsi, la collecte et l'analyse de plumes spécifiques d'individus dont les périodes de mue sont connues permet d'obtenir des informations sur la contamination intégrée des individus au cours de différentes périodes de plusieurs mois. Par exemple, les alcidés (guillemots de Troil *Uria aalge*, mergules nains *Alle alle*, pingouins torda *Alca torda*...) présentent pour la plupart deux séquences de mue par an. A la fin de la saison de reproduction et au début de la période d'hivernage, une première mue complète du plumage a lieu permettant l'apparition du plumage hivernal ainsi que la disparition des ornements nuptiales. A la fin de cette période d'hivernage, une seconde mue partielle se produit, au cours de laquelle seules certaines plumes de couverture sont remplacées pour produire le plumage nuptial [NET 85] , [GAS 98]. L'analyse de contaminants sur des plumes synthétisées au cours de ces deux séquences de mue permet donc de discriminer l'exposition des individus sur leur site de reproduction de celle des sites d'hivernage [FOR 14]. Chez les poussins, les plumes, qui sont synthétisées en continu tout le long de leur période d'élevage, permettent d'obtenir une information intégrée de leur contamination sur l'ensemble de cette période d'élevage et donc de la contamination environnementale à proximité de la colonie, là où leurs parents leur capturent des proies. Ainsi, l'utilisation des plumes des poussins s'avère tout à fait pertinente dans le cadre de la mise en place de la surveillance de la contamination chimique du milieu car la résolution spatiale de l'information apportée est clairement maîtrisée.

Pour les POPs, une étude récente suggère également que ceux qui sont accumulés par les oiseaux marins sont excrétés de manière non sélective par la production d'huile uropygienne [SOL 16]. Ces POPs pourraient ensuite se retrouver dans les plumes lors de leur nettoyage par les oiseaux et leur imprégnation d'huile uropygienne, ce qui est confirmé par des profils similaires obtenus pour les PCBs et les pesticides organochlorés dans le foie, les sécrétions uropygiennes et les plumes [SOL 16]. Cette étude suggère donc que l'huile uropygienne, mais aussi les plumes, sont des tissus utilisables dans l'indication de l'exposition aux POPs des oiseaux marins dans leur environnement [DAU 05].

Enfin, chez les oiseaux marins, les œufs constituent également une voie d'excrétion des contaminants accumulés par les femelles avant le développement des œufs [AGU 05]. Ces contaminants se retrouveront principalement soit dans l'albumen riche en protéines (cas des éléments traces ; [BRA 12], soit dans le jaune riche en lipides (cas des POPs ; [BAR 96] , [VER 06], une très faible partie étant également déposée dans la coquille et la membrane coquillière [PET 17]. La récolte et l'analyse d'œufs permet ainsi l'acquisition non-létale d'informations sur la contamination de l'environnement à laquelle les femelles sont exposées. C'est ainsi, par exemple, qu'ont été mis en évidence dans l'Arctique Canadien des changements d'exposition au cours des dernières décennies des oiseaux marins à la contamination de leur environnement par les POPs ou par le mercure [BRA 01] , [BRA 15] , [BRA 16].

L'utilisation des prélèvements non létaux montre donc aujourd'hui toute sa puissance pour l'utilisation des prédateurs marins supérieurs comme bioindicateurs de la contamination environnementale, dès lors que les quantités de tissus obtenues sont suffisantes pour les mesures de contaminants envisagés. Dans le cas des petites espèces, des choix précis doivent être faits en termes de composés et/ou d'éléments au regard de la quantité de matériel disponible. Prenons par exemple le cas des oiseaux marins de Guyane Française pour illustrer cet aspect.

3) L'exemple des oiseaux marins de Guyane Française utilisés comme bioindicateurs de la contamination chimique de l'environnement

En Guyane Française, l'île du Grand Connétable (figure 2.29) est une réserve naturelle nationale qui abrite six

espèces d'oiseaux marins : la frégate superbe *Fregata superba*, la mouette atricille *Leucophaeus atricilla*, le noddî brun *Anous stolidus* ainsi les sternes Royales *Thalasseus maximus*, de Cayenne *Thalasseus sandvicensis*, et fuligineuses *Onychoprion fuscatus*. Au total, entre 3000 et 5000 couples d'oiseaux marins s'y reproduisent chaque année. Le Grand Connétable constitue ainsi un site exceptionnel pour la conservation de ces espèces. Malgré tout, peu de choses sont connues tant sur l'écologie trophique que sur les niveaux des polluants chez ces prédateurs, alors que, dans le même temps, la contamination par le mercure constitue un problème majeur en Guyane.

Figure 1.29 : Carte de la Guyane Française. L'île du Grand Connétable est la plus grande des îles du Connétable, à environ 40Km à l'est de Cayenne et 18km au nord de l'estuaire de l'Approuague.

Dans ce contexte, la communauté d'oiseaux marins du Grand Connétable a été utilisée pour évaluer le degré de contamination des écosystèmes marins côtiers et pélagiques de Guyane, avec une attention toute particulière pour le mercure du fait de son utilisation à terre par les orpailleurs. Ainsi, les laboratoires LIENSs (Littoral Environnement et Sociétés) et CEBC (Centre d'Etudes Biologiques de Chizé) de l'Université de La Rochelle et du CNRS, en association avec le laboratoire de Toxicologie et le laboratoire d'Ecologie Comportementale et d'Ecophysiologie de l'Université d'Anvers, ont mesuré les polluants dans le sang de poussins et d'adultes de ces six espèces [SEB 16] , [SEB 17]. Le sang des oiseaux a été choisi pour refléter les conditions « locales » pendant la saison de reproduction alors que les plumes auraient été confondantes puisqu'elles intègrent les polluants sur une durée plus longue qui comprend les zones d'alimentation éloignées de la Guyane hors de la période de reproduction. Le sang prélevé chez les oiseaux a été immédiatement centrifugé pour séparer les cellules sanguines où les éléments traces ont été dosés et le plasma où les polluants organiques persistants (POPs) ont été analysés. Pour faire le lien entre les zones d'alimentation et la position trophique des oiseaux avec les polluants, les isotopes stables du carbone et de l'azote ont été analysés en parallèle dans les cellules sanguines.

Les résultats de cette étude montrent que les POPs recherchés : pesticides organochlorés, PCBs et PBDEs (polybromodiphényléthers), présentent des concentrations faibles comparées à celles mesurées chez des oiseaux marins des zones industrialisées ou des hautes latitudes. Ainsi, les PBDEs restaient sous la limite de quantification, que ce soit chez les poussins ou chez les adultes. Pour les POPs, les poussins présentaient des concentrations inférieures à celles des adultes à l'exception des HCHs (hexachlorocyclohexanes). Enfin, le *p,p'*-DDE (dichlorodiphényldichloroéthylène) est le composé le plus abondant dans le plasma des sternes de Cayenne avec des concentrations variant de 160 à 5100 pg.g⁻¹ de poids frais (pf), alors que les PCBs constituent la classe de composés la plus abondante chez les frégate superbe avec des concentrations allant de 330 à 2700 pg.g⁻¹ pf. Ces différences sont à mettre en relation avec l'alimentation pélagique des sternes alors que les frégates consomment beaucoup de poissons benthiques, prises accessoires sans intérêt commercial rejetées par la pêche de crevettes guyanaise. Globalement, les mesures des POPs révèlent d'une part un faible niveau de pollution des eaux de la Guyane française par ces composés organiques, qu'ils soient d'origine industrielle comme les PCBs ou les PBDEs ou d'origine agricole comme les pesticides organochlorés. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus pour les POPs dans le sang des tortues luth de Guyane [GUI 10].

En ce qui concerne les éléments traces métalliques, les concentrations d'argent, de cadmium, de nickel et de vanadium restaient inférieures aux limites de quantification dans le sang des oiseaux de Guyane, que cela soit chez les adultes ou chez les poussins. Pour les éléments essentiels, les concentrations d'arsenic, de cuivre, de fer, de manganèse et de zinc sont du même ordre de grandeur entre les espèces, et comparables à celles d'autres oiseaux marins ailleurs dans le monde. Les valeurs d'arsenic sont comprises entre 1 et 6 µg.g⁻¹ de poids sec (ps) chez les poussins et entre 2 et 21 µg.g⁻¹ ps chez les adultes. Celles de cuivre sont comprises entre 0.5 et 2 µg.g⁻¹ ps, celles du fer entre 2000 et 2600 µg.g⁻¹ ps, celles du manganèse entre 0,1 et 0,4 µg.g⁻¹ ps et celles du zinc entre 17 et 27 µg.g⁻¹ ps quel que soit le stade de vie. Malgré son caractère non essentiel, le plomb présente lui aussi des concentrations faibles et similaires entre poussins et adultes (entre 0.01 et 0.20 µg.g⁻¹ ps). Comme pour les POPs, ces résultats montrent que les eaux guyanaises présentent un niveau de contamination faible pour ces éléments traces.

Au contraire de cette faible variabilité, le mercure montre 1) des concentrations élevées chez les oiseaux marins de Guyane et 2) des concentrations plus faibles chez les poussins que chez les adultes. Ainsi les plus

fortes concentrations se rencontrent chez les adultes des frégates superbes avec de 3,8 à 7,8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ps et les plus faibles chez les sternes fuligineuses avec de 0,6 à 1,1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ps (figure 2.30). Les différences de concentrations du mercure entre les espèces s'expliquent largement par l'écologie trophique des oiseaux. En effet, les corrélations entre mercure et le $\delta^{15}\text{N}$ (figure 2.31) et entre le mercure et le $\delta^{13}\text{C}$ indiquent que les oiseaux ayant la position trophique la plus élevée sont plus exposés au mercure (les frégates) et que ceux qui s'alimentent en zone océanique sont les moins exposés (sternes fuligineuses et noddis bruns). L'exposition forte des oiseaux exploitant les habitats côtiers est liée aux apports terrigènes, notamment en raison des rejets de mercure dus à l'orpaillage. Cette étude montre ainsi l'intérêt d'utiliser les prédateurs supérieurs tels que les oiseaux pour déterminer la contamination du milieu marin.

Figure 1.30 : Relation entre les concentrations de Hg ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ps) et le $\delta^{15}\text{N}$ (‰) chez les poussins et les adultes des 6 espèces d'oiseaux marins de la Réserve du Grand Connétable (d'après Sebastiano et al. 2017).

1.2.6.3 Conclusion

Les mammifères et les oiseaux marins présentent un intérêt majeur pour le suivi de la contamination du milieu dans lequel ils évoluent, et notamment des eaux maritimes françaises. Alors que peu d'études ont été réalisées sur le territoire métropolitain en ce sens, l'exemple de la Guyane apporté ici, mais aussi les différents travaux réalisés dans d'autres territoires français d'outre-mer comme les îles éparses [CAT 08] , [JAQ 08] , [KOJ 07], les Terres Australes et Antarctiques Françaises [BLE 13] , [CAR 13] , [CAR 14] , [CAR 16] , [FON 15] , [FRO 16] ou la Nouvelle-Calédonie [BUS 03] , [GAR 16], tant sur les oiseaux que les mammifères marins, montrent tout l'intérêt d'utiliser les prédateurs supérieurs pour obtenir des informations sur la contamination chimique de la ZEE française. Pour cela, il convient néanmoins de bien connaître l'écologie des espèces et de maîtriser parfaitement les paramètres essentiels pour l'interprétation des mesures (e.g., l'âge des mammifères ou encore l'écologie trophique des prédateurs). La demande européenne dans le cadre de la DCSMM de l'atteinte du bon état écologique des eaux à l'horizon 2020 constitue une opportunité indéniable pour renforcer l'utilisation des prédateurs pour le suivi des contaminants des eaux marines françaises. Si les réseaux d'échouage constituent à ce jour une force (RNE pour les mammifères et RESOM pour les oiseaux), une difficulté liée à l'utilisation d'animaux échoués est l'absence de stratégie d'échantillonnage préalable qui limite la puissance de l'analyse statistique et des comparaisons spatiales, mais également la nécessité d'identifier l'origine des animaux (résidents, migrants). En ce qui concerne les oiseaux marins, des prélèvements non létaux (sang ou plumes) sur les individus nicheurs (soit dans les colonies situées le long des côtes françaises, soit dans des colonies hors territoire métropolitain mais sur des oiseaux hivernants dans les eaux françaises) et choisis pour leurs écologies trophiques différentes (alimentation benthique ou pélagique, côtière ou hauturière, prédateurs piscivores ou omnivores, etc.) permettraient d'éclairer de manière complémentaire le degré de contamination des différents compartiments du milieu marin exploité par ces prédateurs. Un effort en ce sens est donc fortement souhaitable à l'échelle nationale tel que d'autres pays l'ont déjà réalisé (AMAP pour l'Arctique, le Minnesota Loon Monitoring Program pour les grands lacs). La DCSMM représente aujourd'hui un levier pour entreprendre non seulement une démarche nationale pour développer l'utilisation des prédateurs supérieurs pour le suivi de la contamination des eaux françaises mais également pour lancer une démarche concertée entre pays européens. Une telle démarche offrirait la possibilité d'harmoniser les approches méthodologiques et scientifiques à l'échelle européenne et assurerait à la fois une meilleure gestion du risque chimique et un diagnostic permettant la prise de mesure de conservation pour les mammifères et oiseaux marins les plus à risque.

1.3 Conclusion et perspectives

L'étude des effets écotoxicologiques dans le milieu aquatique repose très largement sur une connaissance de la physiologie, de la phylogénie, du génome et du cycle de vie des organismes modèles. Les chercheurs se sont ainsi particulièrement attachés au développement de connaissances sur les mécanismes d'effets des contaminants chimiques à partir des espèces modèles étudiées sur le terrain et en laboratoire.

Ce chapitre illustre les liens entre les connaissances sur la réponse des organismes aux contaminants chimiques et la biosurveillance de l'environnement, au travers d'espèces modèles étudiées de manière complémentaire dans leur habitat naturel et en laboratoire. Ces espèces modèles sont sélectionnées pour leur niche écologique, leur représentativité écologique, qui favorise des études locales, régionales ou à large échelles, leur position dans la chaîne trophique, leur capacité métabolique d'adaptation au stress chimique. Leur sélection répond également dans certain cas à leur valeur économique, et enfin à des critères plus opérationnels comme une large distribution, une collecte facile et une facilité de maintien en aquarium. Le choix des espèces d'étude est d'autant plus important que c'est à partir de l'individu que le défi du changement d'échelle des effets biologiques, depuis le niveau moléculaire à celui des populations des communautés peut être abordé.

Les travaux menés depuis une trentaine d'années ont ainsi évolué de l'étude de mécanismes perturbés très ciblés sur une enzyme, une protéine ou l'ADN pour ensuite intégrer les effets physiologiques et plus récemment, grâce au développement des techniques, les effets génomiques observables au cours du cycle de vie des organismes. Cette intégration est poussée aujourd'hui jusqu'à l'expérimentation de l'histoire de vie de plusieurs générations d'organismes parents pour expliquer les capacités de résilience et d'adaptation des descendants en milieu contaminé.

Les attentes sociétales vis à vis de la réglementation et de l'évaluation du risque chimique sont fortes. L'écotoxicologie est probablement une des disciplines scientifiques pour laquelle la pression sociétale s'exerce de manière la plus directe, du fait de la nécessité réglementaire de prédire et gérer les risques toxiques liés aux substances chimiques.

Les travaux décrits ici en milieu aquatique illustrent les démarches mises en œuvre, en eaux douce et marine pour développer des méthodologies de biosurveillance et d'évaluation du risque toxique, adaptés aux enjeux, à des échelles locales, nationales internationales. Ces démarches sont de plus soucieuses des informations qu'elles apportent sur les causes des perturbations mesurées autant que sur les conséquences sur les populations dans les milieux étudiés. Le transfert méthodologique des outils comme les biomarqueurs ou les bioessais pour la surveillance du milieu marin en zone côtière est plus avancé qu'en eau douce. Aujourd'hui des outils existent mais seuls les plus pertinents répondant aux critères de standardisation pour la biosurveillance (méthodes communes, assurance qualité et seuils d'interprétation) peuvent être recommandés dans des programmes pérennes. Les progrès futurs pour la gestion des milieux devraient passer par une meilleure intégration des méthodologies d'évaluation du risque chimique (prédiction) et de surveillance (diagnostic) développées en milieu aquatique naturel, pour les eaux douces et les eaux marines. Le maintien de réseaux et d'observatoires de surveillance de la qualité des milieux sur le long terme, associant des approches chimiques et biologiques est un enjeu majeur pour améliorer notre compréhension du rôle de la contamination chimique toxique sur le fonctionnement et la biodiversité des milieux et proposer des mesures de gestion adaptées.

Remerciements

Les auteurs du paragraphe 2.2.1. « les gammars comme espèce sentinelle pour la surveillance des milieux aquatiques » remercient l'Agence Nationale de la Recherche pour son soutien financier au travers de deux projets, le projet Gamma (ANR 2011 CESA 021 01) et le projet Proteogam (ANR-14-CE21-0006-01).

Les auteurs du paragraphe 2.2.3 « état de santé des poissons en rivière » remercient également l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques devenu aujourd'hui l'Agence Française de la Biodiversité et l'agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse pour leur soutien financier.

Les auteurs du paragraphe 2.2.5 « les indicateurs écotoxicologiques chez les organismes marins : de la recherche à la réglementation pour la surveillance » remercient l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques devenu aujourd'hui l'Agence Française de la Biodiversité pour son soutien financier.

- [ADD 87] ADDISON R.F., BRODIE P.F. « Transfer of organochlorine residues from blubber through the circulatory system to milk in the lactating grey seal *Halichoerus grypus* », *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, n°44, p. 782–786, 1987.
- [ADD 90] ADDISON R.F., CLARKE K.R. « The IOC/GEEP Bermuda workshop », *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* P138, 1-8, 1990
- [AGU 99] AGUILAR A., BORREL A., PASTOR T. « Biological factors affecting variability of persistent pollutant levels in cetaceans », *Cetacean Research and Management Special Issue*, n°1, p. 83–116, 1999.
- [AGU 05] AGUSA T., MATSUMOTO T., IKEMOTO T., ANAN Y., KUBOTA R., YASUNAGA G., KUNITO T., TANABE S., OGI H., SHIBATA Y. « Body distribution of trace elements in black-tailed gulls from Rishiri Island, Japan: Age-dependent accumulation and transfer to feathers and eggs », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n°24, p. 2107–2120, 2005.
- [ALV 15] ALVAREZ-MUNOZ D., ROSTKOWSKI P.I., HORWOOD J., GREER E., MINIER C., POPE N., LANGSTON W.J., HILL E.M. 2015. « Widespread contamination of coastal sediments in the Transmanche Channel with anti-androgenic compounds », *Marine Pollution Bulletin*, n° 95, p. 590-597, 2015.
- [ALZ 98] ALZIEU C. « Tributyltin : case study of a chronic contaminant in the coastal environment ». *Ocean & Coastal Management*, 40, 23-36, 1998.
- [AN 91] ANDRÉ J.M., BOUDOU A., RIBEYRE F., BERNHARD M. « Comparative study of mercury accumulation in dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from French Atlantic and Mediterranean coasts », *Science of the Total Environment*, n°104, p. 191–209, 1991.
- [ANK 10] ANKLEY G.T., BENNET R.S., ERICKSON R.J., HOFF D.J., HORNUNG M.W., JOHNSON R.D., MOUNT D.R., NICHOLS J.W., RUSSOM C.L., SCHMIEDER P.K., SERRANO J.A., TIETGE J.E., VILLENEUVE D.L. « Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n° 29, p. 730-741, 2010.
- [ARM 14] ARMENGAUD J., TRAPP J., PIBLE O., GEFFARD O., CHAUMOT AI, HARTMANN EM. « Non-model organisms, a species endangered by proteogenomics », *Journal of Proteomics*, n°105, p.5-18, 2014.
- [ARR 12] ARRETE JOURNAL OFFICIEL. Arrêté du 18 décembre 2012 relatif aux critères et méthodes à mettre en œuvre pour l'élaboration des objectifs environnementaux et indicateurs associés du plan d'action pour le milieu marin. Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie. 91-118, 2012
- [ATL 16] ATLI G., GROSELL M. « Characterization and response of antioxidant systems in the tissues of the freshwater pond snail (*Lymnaea stagnalis*) during acute copper exposure », *Aquatic Toxicology*, n° 176, p. 38-44, 2016.
- [AUB 11] AUBER A., ROUCAUTE M., TOGOLA A., CAQUET T. « Structural and functional effects of conventional and low pesticide input crop protection programs on benthic macroinvertebrate communities in outdoor pond mesocosms », *Ecotoxicology*, n° 20, p. 2042–2055, 2016.
- [AUB 13] AUBAIL A., MÉNDEZ-FERNANDEZ P., BUSTAMANTE P., CHURLAUD C., FERREIRA M., VINGADA J.V., CAURANT F. « Use of skin and blubber tissues of small cetaceans to assess the trace element content of internal organs », *Marine Pollution Bulletin*, n°76(1-2), p. 157-168, 2013. [ARM 13] ARMENGAUD J. « Microbiology and proteomics, getting the best of both worlds! », *Environmental Microbiology*, n°15, p. 12-23, 2013.
- [BAI 07a] BAIRD D.J., BROWN S.S., LAGADIC L., LIESS M., MALTBY L., MOREIRA-SANTOS M., SCHULZ R., SCOTT G.I. « *In situ* based effects measures: determining the ecological relevance of measured responses », *Integrated Environmental Management and Protection*, n°3, p 259-267, 2007a.
- [BAI 07b] Baird D.J., Burton G.A., Culp J.M., Maltby L. « Summary and recommendations from a SETAC Pellston workshop on *in situ* measures of ecological effects », *Integrated Environmental Management and Protection*, n°3, p 275-278, 2007b.
- [BAR 96] BARGAR T.A., SCOTT G.I., COBB G.P. « Maternal transfer of contaminants: Case study of the excretion of three polychlorinated biphenyl congeners and technical-grade endosulfan into eggs by white leghorn Chickens (*Gallus domesticus*) », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n°92, p. 13–18, 1996.
- [BAR 14] BARSÌ A., JAGER T., COLLINET M., LAGADIC L., DUCROT V. « Considerations for test design to accommodate energy-budget models in ecotoxicology, p. a case study for acetone in the pond snail *Lymnaea stagnalis* », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n° 33, p. 1466–1475, 2014.
- [BAY 98] BAYNE B.L., ADDISON R.F., CAPUZZO, J.M., CLARKE K.P., GRAY J.Y., MOORE M.N., WARWIK R.M. « An overview of the GEEP workshop » *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46, 235-243, 1998

- [BAY 14] BAYONA Y., ROUCAUTE M., CAILLEAUD K., BASSÈRES A., LAGADIC L., CAQUET T. « Isotopic niche metrics as indicators of toxic stress in two freshwater snails », *Science of the Total Environment*, n° 484, p. 102–113, 2014.
- [BEC 06] HYLLAND K., LANG T., VETHAAK A.D. « Biological effects of contaminants in pelagic ecosystems: The BECPELAG workshop. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)*. Pensacola. ISBN 1-880611-84-8.XXIX. 474p.
- [BED 10] BEDULINA D.S., TIMOFEYEV M.A., ZIMMER M., ZWIRNMANN E., MENZEL R., STEINBERG C.E.W. « Different natural organic matter isolates cause similar stress response patterns in the freshwater amphipod, *Gammarus pulex*°», *Environmental Science and Pollution Research*, n°17, p 261-9, 2010.
- [BEK 12] BEKETOV M.A., LIESS A. « Ecotoxicology and macroecology – Time for integration », *Environmental Pollution*, n° 162, p. 247-254, 2012.
- [BER 16] BERHENS D., ROUXEL J., BURGEOT T., AKCHA F. «Comparative embryotoxicity and genotoxicity of the herbicide diuron and its metabolites in early life stages of *Crassostrea gigas*: implication of reactive oxygen species production. *Aquatic Toxicology* », n° 175, p.249-259, 2016.
- [BES 13] BESNARD A.-L., BOUÉTARD A., AZAM D., COUTELLEC M.-A. « Isolation and characterization of three new multiplex sets of microsatellite markers in the hermaphroditic freshwater snail *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Hygrophila) using 454-pyrosequencing technology », *Molecular Ecology Resources, Permanent Genetic Resource Note*, n° 13, p. 158-159, 2013.
- [BES 13] BESSE J.P., COQUERY M., LOPES C., CHAUMOT A., BUDZINSKI H., LABADIE P., GEFFARD O. « Caged *Gammarus fossarum* (crustacea) as a robust tool for the characterization of .bioavailable contamination levels in continental waters: Toward the determination of threshold values°», *Water Research*, n°47, p. 650-660, 2013.
- [BIC 11] BICKHAM J.W. « The four cornerstones of evolutionary toxicology », *Ecotoxicology*, n° 20, p. 497–502, 2011.
- [BIC 00] BICKHAM J.W., SANDHU S., HEBERT P.D.N., CHIKHI L., ATHWAL R. « Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology », *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, n° 463, p. 33–51, 2000.
- [BIJ 12] BIJLSMA R., LOESCHKE V. « Genetic erosion impedes adaptive responses to stressful environments », *Evolutionary Applications*, n° 5, p. 117–129, 2012.
- [BLE 13] BLÉVIN P., CARRAVIERI A., JAEGER A., CHASTEL O., BUSTAMANTE P., CHEREL Y. « Wide range of mercury contamination in chicks of Southern Ocean seabirds », *Plos One*, n°8(1), p e54508, 2013.
- [BLO 96] BLOCKWELL S.J., PASCOE D., TAYLOR E.J. « Effects of lindane on the growth of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L)°», *Chemosphere*, n°32, p. 1795-1803, 1996.
- [BLO 05a] BLOOR M.C., BANKS C.J., KRIVTSOV V. « Acute and sublethal toxicity tests to monitor the impact of leachate on an aquatic environment°», *Environment International*, n°31, P.269-273, 2005
- [BLO 05b] BLOWS M.W., HOFFMANN A.A. « A reassessment of genetic limits to evolutionary change », *Ecology*, n° 86, p. 1371–1384, 2005.
- [BLO 06] BLOOR M.C., BANKS C.J. « An evaluation of mixed species in-situ and ex-situ feeding assays: The altered response of *Asellus aquaticus* and *Gammarus pulex*°», *Environment International*, n°32, P 22-27, 2006.
- [BOI 16] BOISSEAU P., DELIGNETTE-MULLER M.-L., ABBACI K., THOMAS H., GARRIC J. « Analysis of hemocytes in *Lymnaea stagnalis*: characterization and effects of repeated hemolymph collections », *Fish & Shellfish Immunology*, n°57, p. 116-126, 2016.
- [BOL 01] BOLS, N. C., BRUBACHER J. L., GANASSIN R. C., LEE J.L. E. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 25(8-9): 853-873, 2001
- [BOU 05] BOUCHET P., ROCROI J.-P. « Classification and nomenclator of gastropod families », *Malacologia*, n° 47, p. 1-397, 2005.
- [BOU 13] BOUÉTARD A., BESNARD A.-L., VASSAUX D., LAGADIC L., COUTELLEC M.-A. « Impact of the redox-cycling herbicide diquat on transcript expression and antioxidant enzymatic activities of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* », *Aquatic Toxicology*, n° 126, p. 256-265, 2013.

- [BOU 14] BOUÉTARD A., CÔTE J., BESNARD A.-L., COLLINET M., COUDELLEC M.-A. « Environmental versus anthropogenic effects on population adaptive divergence in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* », *PLoS ONE*, n° 9, e106670, 2014.
- [BOU 12] BOUÉTARD A., NOIROT C., BESNARD A.-L., BOUCHEZ O., CHOISNE D., ROBE E., KLOPP C., LAGADIC L., COUDELLEC M.-A. « Pyrosequencing-based transcriptomic resources of the pond snail *Lymnaea stagnalis* with a focus on genes involved in molecular response to diquat-induced stress », *Ecotoxicology*, n° 21, p. 2222-2234, 2012.
- [BRA 12] BRASSO R.L., ABEL S., POLITO M.J. « Pattern of mercury allocation into egg components is independent of dietary exposure in Gentoo penguins », *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, n°62, p. 494-501, 2012.
- [BRA 87] BRAUNE B.M., GASKIN D.E. « A mercury budget for the Bonaparte's gull during autumn moult », *Ornis Scandinavica*, n°18, p. 244-250, 1987.
- [BRA 01] BRAUNE B.M., DONALDSON G.M., HOBSON K.A. « Contaminant residues in seabird eggs from the Canadian Arctic. Part I. Temporal trends 1975-1998 », *Environmental Pollution*, n°114, p. 39-54, 2001.
- [BRA 05] BRAUNE B.M., OUTRIDGE P.M., FISK A.T., MUIR D.C., HELM P.A., HOBBS K., HOEKSTRA P.F., KUZYK Z.A., KWAN M., LETCHER R.J., LOCKHART W.L. « Persistent organic pollutants and mercury in marine biota of the Canadian Arctic: an overview of spatial and temporal trends », *Science of the Total Environment*, n°351, p. 4-56, 2005.
- [BRA 15] BRAUNE B.M., GASTON A.J., HOBSON K.A., GILCHRIST H.G., MALLORY M.L. « Changes in trophic position affect rates of contaminant decline at two seabird colonies in the Canadian Arctic », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, n°115, p. 7-13, 2015.
- [BRA 16] BRAUNE B.M., GASTON A.J., MALLORY M.L. « Temporal trends of mercury in eggs of five sympatrically breeding seabird species in the Canadian Arctic », *Environmental Pollution*, n°214, 124-31, 2016.
- [BRI 11] BRIX K.V., ESBAUGH A.J., GROSELL M. « The toxicity and physiological effects of copper on the freshwater pulmonate snail *Lymnaea stagnalis* », *Comparative Biochemistry and Physiology*, n° 154C, p. 261–267, 2011.
- [BRI 17] BRIX K.V., SCHLEKAT C.E., GARMAN E.R. « The mechanisms of nickel toxicity in aquatic environments, p. an adverse outcome pathway (AOP) analysis », *Environmental Toxicology and Chemistry*, DOI, p. 10.1002/etc.3706, 2017.
- [BRO 90] BROMAN D.C., NAUF C., LUNDBERGH I., ZEBUHR Y. « An *in situ* study on the distribution, biotransformation and flux of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an aquatic food chain from the Baltic: an ecotoxicological perspective », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n°9, p. 429–442, 1990.
- [BRO 06] BROEG K., LETHONEN K.K. Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: Integrated assessment of a multi-biomarker approach. *Mar Poll.Bull*, 53: 508-522, 2006
- [BUN 11] BUNDSCHUH M., ZUBROD J.P., SEITZ F., STANG C., SCHULZ R. « Ecotoxicological evaluation of three tertiary wastewater treatment techniques via meta-analysis and feeding bioassays using *Gammarus fossarum* », *Journal of Hazardous Materials*, n°192, p. 772-778, 2011.
- [BUR 92] BURGEOT T., BOCQUENE G., TRUQUET P., LE DEAN L., POULARD J.C., DOREL D., SOUPLLET A., GALGANI F. «The Dragonet (*Callionymus lyra*), a target species used for evaluation of the biological effects of chemical contaminants on french coasts». *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 97 : 309-316, 1992
- [BUR 94a] BURGEOT T., BOCQUENE G., PINGRAY G., GODEFFROY D., LEGRAND J., DIMEET J., MARCO F., VINCENT F., HENOCQUE Y., OGER JEANNERET H., GALGANI D. E. F. «Monitoring biological effects of contamination in marine fish along french coasts by measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase activity». *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 131-147, 1994a.
- [BUR 94b] BURGEOT T., BOCQUENE G., TRUQUET P., LE DEAN L., GALGANI F. «Induction of EROD activity in red mullet (*Mullus barbatus*) along the french Mediterranean coasts». *Sci. Tot. Environ.* 142 : 213-220, 1994b
- [BUR 96] BURGEOT T., BOCQUENE G., PORTE C., PFHOM-LEZKOWICZ A., SANTELLA R.M., RAOUX C., DIMEET J., GALGANI F. «Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern part of the Mediterranean sea». *Mar. Ecol. Prog. Ser.*131: 125-141, 1996

- [BUR 98] BURGEOT T., GALGANI F. Application de l'EROD chez les poissons marins dans un programme pluridisciplinaire de surveillance de la Mer du Nord, in Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard et F. Ramade (Eds), Utilisation des biomarqueurs pour la surveillance de la Qualité de l'Environnement, Tec & Doc Lavoisier, Paris 33-56.1998
- [BUR 00] BURGEOT T., MINIER C., BOCQUENE G., VINCENT F., CACHOT J., LOIZEAU V., JAOUEN P., LESUEUR P., MIRAMAND P., GUYOT T., ROCHARD E. BOET P. Des organismes sous stress. Collection de 15 fascicules du programme Scientifique Seine Aval. Eds IFREMER., 39p. 2000
- [BUS 03] BUSTAMANTE P., GARRIGUE C., BREAU L., CAURANT F., DABIN W., GREAVES J., DODÉMONT R. « Trace elements in two odontocetes species (*Kogia breviceps* and *Globicephala macrorhynchus*) stranded in New Caledonia (South Pacific) », *Environmental Pollution*, n°124, p. 263–271, 2003.
- [CAQ 13] CAQUET T. « Aquatic mesocosms in ecotoxicology », dans J.F. FÉRARD, C. Blaise (dir.), *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*, Springer, The Netherlands, 2013.
- [CAR 13] CARRAVIERI A., BUSTAMANTE P., CHURLAUD C., CHEREL Y. « Penguins as bioindicators of mercury contamination in the Southern Ocean: Birds from the Kerguelen Islands as a case study », *Science of the Total Environment*, n°454-455, p. 141-148, 2013.
- [CAR 14] CARRAVIERI A., CHEREL Y., BLÉVIN P., BRAULT-FAVROU M., CHASTEL O., BUSTAMANTE P. « Mercury exposure in a large subantarctic avian community ». *Environmental Pollution*, n°190C, p. 51-57, 2014.
- [CAR 16] CARRAVIERI A., CHEREL Y., JAEGER A., CHURLAUD C., BUSTAMANTE P. « Penguins as bioindicators of mercury contamination in the southern Indian Ocean: geographical and temporal trends », *Environmental Pollution*, n°213C, p. 195-205, 2016.
- [CAS 92] CASTANET J., MEUNIER F.J., FRANCILLON-VIEILLOT H. « Squeletteochronologie à partir des os et des dents chez les vertébrés » In: Baglinière JL, Castanet J, Conand F, Meunier FJ (eds). Tissus durs et âge individuel des vertébrés. Paris, ORSTOM, INRA, p. 257-280, 1992.
- [CAT 08] CATRY T., RAMOS J.A., LE CORRE M., KOJADINOVIC J., BUSTAMANTE P. « The role of stable isotopes and mercury concentrations to describe seabird foraging ecology in tropical environments », *Marine Biology*, n°155(6), p. 637–647, 2008
- [CAS 01] CASWELL H. *Matrix Population Models*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, 2001.
- [CHA 65] CHARNIAUX-COTTON H. « Hormonal control of sex differentiation in invertebrates » Dans R.L. Dehaan, H. Ursprung, *Organogenesis*, New York, Holt, Rinehart, and Winston: 701-740, 1965.
- [CHA 10] CHANDESRI, A. AND N. MENGIN. Réseau de référence : Eléments de réflexion pour un complément du réseau existant, Pôle Hydroécologie Cours d'eau ONEMA CEMAGREF: 11p, 2010
- [CHA 13] CHARRON L., GEFFARD O., CHAUMOT A., COULAUD R., QUEAU H., GEFFARD A., DEDOURGE-GEFFARD O. « Effect of water quality and confounding factors on digestive enzyme activities in *Gammarus fossarum* », *Environmental Science and Pollution Research*, n°20, p. 9044-9056, 2013.
- [CHE 06] CHESMAN B.S., LANGSTON W.J. « Intersex in the clam *Scrobicularia plana*: a sign of endocrine disruption in estuaries? », *Biological Letters*, n° 2, p. 420–422, 2006.
- [CHO 12] CHOUVELON T., SPITZ J., CAURANT F., MÉNDEZ-FERNANDEZ P., AUTIER J., LASSUS-DÉBAT A., CHAPPUIS A., BUSTAMANTE P. « Enhanced bioaccumulation of mercury in deep-sea fauna from the Bay of Biscay (North-East Atlantic) revealed by stable isotope analysis », *Deep-Sea Research Part I*, n°65, p. 113–124, 2012.
- [CIL 17] CILIBERTI A., CHAUMOT A., RECOURA-MASSAQUANT R., CHANDESRI A., FRANÇOIS A., COQUERY M., FERREOL M., GEFFARD O. 2017. « CAGED GAMMARUS AS BIOMONITORS IDENTIFYING THRESHOLDS OF TOXIC METAL BIOAVAILABILITY THAT AFFECT GAMMARID DENSITIES AT THE FRENCH NATIONAL SCALE », *WATER RESEARCH*, n°118, p. 131-140.
- [CIO 12] CIOCAN C.M., CUBERO-LEON E., PECK M.R., LANGSTON W.J., POPE N., MINIER C., ROTCHELL J.M. « Intersex in *Scrobicularia plana* transcriptomic analysis reveals novel genes involved in endocrine disruption », *Environmental Science and Technology*, n° 46, p. 12936–12942, 2012.
- [COL 04] COLD A., FORBES V.E. « Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and

reproduction of *Gammarus pulex*», *Aquatic Toxicology*, n°67, p. 287-299, 2004.

[COL 11] COLBOURNE J.K., PFRENDER M.E. et al. « The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex* », *Science*, n°331, p. 555-561, 2011

[COR 01] CORREIA A.D., COSTA F.O., NEUPARTH T., DINIZ M.E., COSTA M.H. « Sub-lethal Effects of Copper-Spiked Sediments on the Marine Amphipod *Gammarus locusta* : Evidence of Hormesis ? », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, n°2, p. 32-38, 2001.

[COT 15] CÔTE J., BOUÉTARD A., PRONOST Y., BESNARD A.L., COKE M., PIQUET F., CAQUET T., COUTELLEC M.-A. « Genetic variation of tolerance to copper: a test of selection hypotheses and its relevance for ecological risk assessment », *Environmental Pollution*, n° 205, p. 209-217, 2015.

[COU 11] COULAUD R., GEFFARD O., XUEREB B., LACAZE E., QUÉAU H., GARRIC J., CHARLES S., CHAUMOT A. « *In situ* feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring », *Water Research*, n°45, p. 6417-6429, 2011.

[COU 14] COULAUD R., GEFFARD O., COQUILLAT A., QUÉAU H., CHARLES S., CHAUMOT A. « Ecological modeling for the extrapolation of ecotoxicological effects measured during *in situ* assays in *Gammarus* », *Environmental Science and Technology*, n°48, p. 6428-6436, 2014. [COU 06] COUTELLEC M.-A., LAGADIC L. « Effect of self-fertilization, environmental stress and exposure to xenobiotics on fitness related traits of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* », *Ecotoxicology*, n° 15, p.199-213, 2006.

[COU 08a] COUTELLEC M.-A., DELOUS G., CRAVEDI J.-P., LAGADIC L. « Effects of the mixture of diquat and a nonylphenol polyethoxylate adjuvant on fecundity and progeny early performances of the pond snail *Lymnaea stagnalis* in laboratory bioassays and microcosms », *Chemosphere*, n° 73, p. 326-336, 2008.

[COU 08b] COUTELLEC M.-A., CAQUET T., LAGADIC L. « *Lymnaea stagnalis*: the effects of experimental demographic reduction on population dynamics », In R Akçakaya, J Stark, & TS Bridges (eds), *Demographic Toxicity, p. Methods in Ecological Risk Assessment*. Oxford University Press., Oxford., UK. pp 152-167, 2008.

[COU 11a] COUTELLEC M.-A., CAQUET T. « Heterosis and inbreeding depression in bottlenecked populations: a test in the hermaphroditic freshwater snail *Lymnaea stagnalis* », *Journal of Evolutionary Biology*, n° 24, p. 2248-2257, 2011.

[COU 11b] COUTELLEC M.-A., COLLINET M., CAQUET T. « Parental exposure to pesticides and progeny reaction norm to a biotic stress gradient in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* », *Ecotoxicology*, n° 20, p. 524-524, 2011.

[COU 11c] COUTELLEC M.-A., BARATA C. « An introduction to evolutionary processes in ecotoxicology », *Ecotoxicology*, n° 20, p. 493-496, 2011.

[COU 14] COUTELLEC M.-A., BOUÉTARD A., CÔTE J., HOEDE C., BOUCHEZ O., BALZERGUE S., MARTIN-MAGNIETTE M.-L. « Evolutionary response to pollutants: a focus on transcriptomic expression of a freshwater snail », SETAC North America 35th Annual Meeting, Vancouver 9-13 November 2014.

[COU 16a] COUTELLEC M.-A., CAQUET T. « Gastropod ecophysiological response to stress », dans A.S.M. Saleuddin, T.S. Mukai (dir.), *Physiology of Molluscs*, Apple Academic Press, p. 303-396, 2016.

[COU 16b] COUTELLEC M.-A., ECHASSERIAU Y., THOMÉ J.-P., LEGRAND E., BOULANGÉ-LECOMTE C., FORGET-LERAY J., COKE M., COLLINET M., MARSAUD N., HOEDE C., DUCROT V., LAGADIC L. « Predictive potential of molecular biomarkers of endocrine disruption in the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*: transcriptomic and proteomic responses vs reproductive output », SETAC/iEOS Joint Focused Topic Meeting on "Environmental and (eco)toxicological Omics and Epigenetics: Science, Technology and Regulatory Applications", Ghent, Belgium, 12-15 September 2016.

[COUL 13] COULAUD R., MOUTHON J., QUÉAU H., CHARLES S., CHAUMOT A. « Life history phenology strongly influences population vulnerability to toxicants: a case study with the mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n° 32, p. 1727-1736, 2013.

[COUT 13a] COUTELLEC M.-A., BESNARD A.-L., CAQUET T. « Population genetics of *Lymnaea stagnalis* experimentally exposed to cocktails of pesticides », *Ecotoxicology*, n° 22, p. 879-888, 2013.

[COUT 13b] COUTELLEC M.-A., BARATA C. « Special issue on long-term ecotoxicological effects: an introduction », *Ecotoxicology*, n° 22, p. 763-766, 2013.

[CRA 07] CRANE M., BURTON G.A., CULP J.M., GREENBERG M.S., MUNKITTRICK K.R., RIBEIRO R., SALAZAR M.H., ST-JEAN S.D. « Review of aquatic *in situ* approaches for stressor and effect diagnosis », *Integrated*

Environmental Assessment and Management, n°3, p. 234-245, 2007.

[CRA 95] CRANE M., DELANEY P., WATSON S., PARKER P., WALKER C. « The effect of malathion-60 on *Gammarus pulex* (L) below watercress beds », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n°14, p. 1181-1188, 1995.

[CRA 96] CRANE M., JOHNSON I., MALTBY L. « *In situ* assays for monitoring the toxic impacts of waste in rivers », In *Toxic Impacts of Wastes on the Aquatic Environment* (ed. J.F. Trapp, S.M. Hunt & J.R. Wharfe), p. 116-124. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1996.

[CUV 91] CUVIN-ARALAR A., FURNESS R.W. « Mercury and selenium interaction: a review », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, n°21, p. 348-364, 1991

[DAV 09] DAVISON A., FRENCH H.T., MORAY C., WHEATLEY H., SEARLE L.J., EICHORN M.P. « Mating behaviour in *Lymnaea stagnalis* pond snails is a maternally inherited, lateralised trait », *Biology Letters*, n° 5, p. 20-22, 2009.

[DAV 12] DAVIES I.M. AND VETHAAK D. « Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects ». *ICES Cooperative Research Report*. N° 315, November 2012. 277pp, 2012

[DAU 05] DAUWE T., JASPERS V., COVACI A., SCHEPENS P., EENS M. « Feathers as a nondestructive biomonitor for persistent organic pollutants », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n°24(2), p. 442-449, 2005.

[DED 09] DEDOURGE-GEFFARD O., PALAIS F., BIAGIANTI-RISBOURG S., GEFFARD O., GEFFARD A. « Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: An *in situ* experiment », *Chemosphere*, n°77, p. 1569-1576, 2009.

[DES 12] DESFORGES J.P.W., ROSS P.S., LOSETO L.L. « Transplacental transfer of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in arctic beluga whales (*Delphinapterus leucas*) », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n°31, p.296-300, 2012.

[DEH 05] DEHN L.A., SHEFFIELD G.G., FOLLMANN E.H., DUFFY L.K., THOMAS D.L., BRATTON G.R., TAYLOR R.J., O'HARA T.M. « Trace elements in tissues of phocid seals harvested in the Alaskan and Canadian Arctic: influence of age and feeding ecology », *Canadian Journal of Zoology*, n°83, p. 726-746, 2005.

[DIE 09] DIETZ R., OUTRIDGE P.M., HOBSON K.A. « Anthropogenic contributions to mercury levels in present-day Arctic animals-a review », *Science of the Total Environment*, n°407, p. 6120-6131, 2009.

[DUC 06] DUCROT V., COGNAT C., MONS R., MOUTHON J., GARRIC J. « Development of rearing and testing protocols for a new freshwater sediment test species, the gastropod *Valvata piscinalis* », *Chemosphere*, n° 62, p. 1272-1281, 2006.

[DUC 10a] DUCROT V., TEIXEIRA-ALVES M., LOPES C., DELIGNETTE-MULLER M.-L., CHARLES S., LAGADIC L. « Development of partial life-cycle experiments to assess the effects of endocrine disruptors on the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*: a case-study with vinclozolin », *Ecotoxicology*, n° 19, p. 1312-1321, 2010.

[DUC 10b] DUCROT V., PÉRY A., LAGADIC L. « Modelling effects of diquat under realistic exposure patterns in genetically differentiated populations of the gastropod *Lymnaea stagnalis* », *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365, p. 3485-3494, 2010.

[DUC 14] DUCROT V., ASKEM C., AZAM D., BRETTSCHEIDER D., BROWN R., CHARLES S., COKE M., COLLINET M., DELIGNETTE-MULLER M.-L., FORFAIT-DUBUC C., HOLBECH H., HUTCHINSON T., JACH A., KINNBERG K.L., LACOSTE C., LE PAGE G., MATTHIESSEN P., OEHLMANN J., RICE L., ROBERTS E., RUPPERT K., ELPHINSTONE DAVIS J., VEAUUVY C., WELTJE L., WORTHAM R., LAGADIC L. « Development and validation of an OECD reproductive toxicity test guideline with the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Gastropoda) », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, n° 70, p. 605-614, 2014.

[DUV 16] DUVAL A., COLLINET M., COKE M., COUTELLEC M.-A. « Evolution of *Lymnaea stagnalis* inbreeding depression under pesticide chronic exposure », SETAC Europe 26th Annual Meeting, Nantes, France, 22-26 May 2016.

[EFS 14] EFSA PPR Panel (EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues), 2014. Scientific Opinion on good modelling practice in the context of mechanistic effect models for risk assessment of plant protection products. EFSA Journal n°12, 3589, 92 pp.

[ESC 11] ESCOBAR J.S., AULD J.R., CORREA AC., ALONSO J.M., BONY Y.K., COUTELLEC M.-A., KOENE J.M.,

- POINTIER J.-P., JARNE P., DAVID P. « Patterns of mating-system evolution in hermaphroditic animals: correlations among selfing rate, inbreeding depression and timing of reproduction », *Evolution*, n° 65, p. 1233-1253, 2011.
- [FAU 03] FAUST, M., ALTENBURGER, R., BACKHAUS, T., BLANCK, H., BOEDEKER, W., GRAMATICA, P., HAMER, V., SCHOLZE, M., VIGHI, M., GRIMME, L.H. « Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action », *Aquatic Toxicology*, n°63, p 46–63, 2003.
- [FEL 08a] FELTEN V., CHARMANTIER G., CHARMANTIER-DAURES M., AUJOLAT F., MONS R., GEFFARD A., ROUSSELLE P., GARRIC J., GEFFARD O. « Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium », *Aquatic Toxicology*, n°86, p. 413-425, 2008a.
- [FEL 08b] FELTEN V., CHARMANTIER G., CHARMANTIER-DAURES M., AUJOLAT F., GARRIC J., GEFFARD O. « Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* exposed to acid stress », *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, n°147, p. 189-197, 2008b.
- [FEN 09] FENG Z.-P., ZHANG Z., VAN KESTEREN R.E., STRAUB V., VAN NIEROP P., JIN K., NEJATBAKHS N., GOLDBERG J.I., SPENCER G., YEOMAN M., WILDERING W., COORSSSEN J.R., CROLL R.P., BUCK L., SYED N.I., SMIT A.B. « Transcriptome analysis of the central nervous system of the mollusc *Lymnaea stagnalis* », *BMC Genomics*, n° 10, p. 451, 2009.
- [FON 15] FONTAINE M., CARRAVIERI A., SIMON-BOUHET B., BUSTAMANTE P., GASCO N., BAILLEUL F., GUINET C., CHEREL Y. « Ecological tracers and at-sea observations document the foraging ecology of southern long-finned pilot whales (*Globicephala melas edwardii*) in Kerguelen waters », *Marine Biology*, n°162(1), p. 207–219, 2015.
- [FOR 87] Forbes S.A., « The lake as a microcosm », *Bull. Sci. Assoc.*, Peoria, Illinois pp 77-87. Reprinted in Illinois Nat. Hist. Survey Bulletin 15, art. 9, 537-550, 1887.
- [FOR 01] FORBES V.E., CALOW P., SIBLY R.M. « Are current species extrapolation models a good basis for ecological risk assessment? », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n° 20, p. 442-447, 2001.
- [FOR 03] FORBES V.E., SIBLY R.M., LINKE-GAMENICK I. « Joint effects of population density and toxicant exposure on population dynamics of *Capitella sp.* », *Ecological Applications*, n°13, p. 1094-1103, 2003.
- [FOR 06 a] FORBES V.E., PALMQVIST A., BACH L. « The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n° 25, p. 272–280, 2006a.
- [FOR 06b] FORD A.T., FERNANDES T.F., READ P.A., ROBINSON C.D., DAVIES I.M. « Can pollution cause intersexuality in the amphipod, *Echinogammarus marinus*? », *Marine Pollution Bulletin*, n° 53, p. 100–106, 2006b.
- [FOR 08] FORBES V.E., CALOW P., SIBLY R.M. « The extrapolation problem and how population modeling can help », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n°27, p. 1987-1994. 2008.
- [FOR 14] FORT J., ROBERTSON G.J., GRÉMILLET D., TRAINSEL G., PHILLIPS R.A., BUSTAMANTE P. « Spatial ecotoxicology: migratory Arctic seabirds are contaminated by mercury while overwintering in the Northwest Atlantic », *Environmental Science and Technology*, n°48(19), p. 11560–11567, 2014.
- [FOR 15] FORT J., LACOUÉ-LABARTHE T., NGUYEN HANH L., BOUÉ A., SPITZ J., BUSTAMANTE P. « Mercury in wintering seabirds, an aggravating factor to winter wrecks? », *Science of the Total Environment*, n°527-528C, p. 448-454, 2015.
- [FOS 12] FOSSI-TANKOUA O., AMIARD-TRIQUET C., DENIS F., MINIER C., MOUNEYRAC C., BERTHET B. Physiological status and intersex in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* from thirteen estuaries in Northwest France. *Environmental Pollution*, n° 167, p. 70-77, 2012.
- [FOX 11] FOX C.W., REED D.H. « Inbreeding depression increases with environmental stress: an experimental study and meta-analysis », *Evolution*, n° 65, p. 246-258, 2011.
- [FRA 10] FRANCO A., JOUAUX A., MATHIEU M., SOURDAINE P., LELONG C., KELLNER K. BERTHELIN C. H. « Proliferating cell nuclear antigen in gonad and associated storage tissue of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: seasonal immunodetection and expression in laser micro-dissected tissues », *Cell Tissue Research*, n° 340, p. 201–210, 2010.
- [FRO 16] FROMANT A., CARRAVIERI A., BUSTAMANTE P., LABADIE P., BUDZINSKI H., PELUHET L., CHURLAUD C., CHASTEL O., CHEREL Y. « Wide range of metallic and organic contaminants in various tissues of the Antarctic prion, a planktonophagous seabird from the Southern Ocean », *Science of the Total Environment*, n°544C, p. 754-764, 2016.

- [FUR 97] FURNESS R.W., CAMPHUYSEN K.C.J. « Seabirds as monitors of the marine environment », *ICES Journal of Marine Science*, n°54, p. 726–737, 1997.
- [GAL 10] GALIC N., HOMMEN U., BAVECO J.M., VAN DEN BRINK P.J. « Potential application of population models in the European ecological risk assessment of chemicals II: Review of models and their potential to address environmental protection aims^o », *Integrated Environmental Assessment and Management*, n°6, p. 338-360, 2010.
- [GAR 01] GARRIGUES PH., HARTMUT B., WALKER C.H., NARBONNE J.F. «Biomarkers in Marine Organisms : A practical approach». Edited by Garrigues Ph., Barth H., Wlaker C.H. And J.F. Narbonne. ISBN : 0-444-82913-X550pp. 2001
- [GAR 06] GARCÍA-DE LA PARRA, L. M., BAUTISTA-COVARRUBIAS J. C., RIVERA-DE LA ROSA N., BETANCOURT-LOZANO M. , GUILHERMINO L. Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65(3): 372-380, 2006.
- [GAR 16] GARRIGUE C., OREMUS M., DODÉMONT R., BUSTAMANTE P., KWIA TEK O., LIBEAU G., LOCKYER C., VIVIER J.C., DALEBOUT M.L. « A mass stranding of seven Longman's beaked whales (*Indopacetus pacificus*) in New Caledonia, South Pacific », *Marine Mammal Science*, n°32(3), p. 884–910, 2016.
- [GAS 98] GASTON A.J., JONES I.L. « Bird families of the world: the auks ». Oxford University press, Oxford, 1998.
- [GEF 07] GEFFARD A, QUÉAU H, DEDOURGE O, BIAGIANTI-RISBOUG S, GEFFARD O. « Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*^o », *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, n°145, p. 632-640, 2007.
- [GEF 10] GEFFARD O., XUEREB B., CHAUMOT A., GEFFARD A., BIAGIANTI S., NOËL C., ABBACI K., GARRIC J., CHARMANTIER G., CHARMANTIER-DAURES M. « Ovarian Cycle and Embryonic Development in *Gammarus fossarum*: Application for Reproductive Toxicity Assessment^o », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n°29, p. 2249-2259, 2010.
- [GER 84] GERAERTS W.P.M., JOOSSE J. « Freshwater snails (Basommatophora) », dans A.S. Tompa, N.H. Verdonk, J.A.M. van den Biggelaar (dir.), *The Mollusca, Reproduction.*, vol 7, London, Academic Press, London, 1984.
- [GIA 17] GIANUCA D., PHILLIPS R.A., TOWNLEY S., VOTIER S.C. « Global patterns of sex-and age-specific variation in seabird bycatch », *Biological Conservation*, n°205, p. 60-76, 2017.
- [GIU 13] GIUSTI A., LEPRINCE P., MAZZUCHELLI G., THOMÉ J.-P., LAGADIC L., DUCROT V., JOAQUIM-JUSTO C. « Proteomic analysis of the reproductive organs of the hermaphroditic gastropod *Lymnaea stagnalis* exposed to different endocrine disrupting chemicals », *PLoS ONE*, n°8(11) e81086, 2013.
- [GIU 14] GIUSTI A., LAGADIC L., BARSÌ A., THOMÉ J.-P., JOACHIM-JUSTO C., DUCROT V. « Investigating apical adverse effects of four endocrine active substances in the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis* », *Science of the Total Environment*, n° 493, p. 147–155, 2014.
- [GIS 12] GISMONDI E., RIGAUD T., BEISEL J.N., COSSU-LEGUILLE C. « Microsporidia parasites disrupt the responses to cadmium exposure in a gammarid^o », *Environmental Pollution*, n°160, p. 17-23, 2012.
- [GOM 09] GOMES T., GONZALEZ-REY M., BEBIANNO M.J. « Incidence of intersex in male clams *Scrobicularia plana* in the Guadiana Estuary (Portugal) », *Ecotoxicology*, n° 18, p. 1104-1109, 2009
- [GON 07] GONZÁLEZ-SOLÍS J., CROXALL J.P., ORO D., RUIZ X. « Trans-equatorial migration and mixing in the wintering areas of a pelagic seabird », *Frontiers in Ecology and the Environment*, n°5, p. 297-301, 2007.
- [GRO 01] GROSS M.Y., MAYCOCK D.S., THORNDYKE M.C. MORRIT D., CRANE M. « Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works^o », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n°20, p. 1792-1797, 2001.
- [GUI 10] GUIRLET E., DAS K., THOME J.P., GIRONDOT M. « Maternal transfer of chlorinated contaminants in the leatherback turtles, *Dermochelys coriacea*, nesting in French Guiana », *Chemosphere*, n°79, p. 720-726, 2010.
- [GUS 13a] GUST, M., FORTIER M., GARRIC J., FOURNIER M., GAGNÉ F. « Immunotoxicity of surface waters contaminated by municipal effluents to the snail *Lymnaea stagnalis* », *Aquatic Toxicology*, n° 126, p. 393-403, 2013a.

- [GUS 13b] GUST M., FORTIER M., GARRIC J., FOURNIER M., GAGNÉ F. « Effects of short-term exposure to environmentally relevant concentrations of different pharmaceutical mixtures on the immune response of the pond snail *Lymnaea stagnalis* », *Science of the Total Environment*, n° 445, p. 210-218, 2013b.
- [HAB 95] HABDIJA I., LATJNER J., BELINIC I. « The contribution of gastropod biomass in macrobenthic communities of a karstic river », *International Review of Hydrobiology*, 80, p. 103–110, 1995.
- [HAG 08] HAGGER J.A., JONES M.B., LOWE D., LEONARD D.R.P., OWEN R., GALLOWAY T.S. « Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: A case study », *Marine Pollution Bulletin*, n°56, p. 1111-1118, 2008.
- [HAN 06] HANSSON T., LINDESJÖÖ E., FÖRLIN L., BALK L., BIGNERT A., LARSON A. « Long-term monitoring of the health status of female perch (*Perca fluviatilis*) in the Baltic sea shows decreased gonad weight and increased hepatic EROD activity ». *Aquatic Toxicology* 79, 341-355, 2006.
- [HAN 10] HANSON N., FÖRLIN L., LARSSON Å. « Spatial and annual variation to define the normal range of biological endpoints: An example with biomarkers in perch », *Environmental Toxicology And Chemistry*, n°29, p. 2616-2624, 2010.
- [HAL 06] HALL A.J., HUGUNIN K., DEAVILLE R., LAW R.J., ALLCHIN C.R., JEPSON P.D. « The risk of infection from polychlorinated biphenyl exposure in harbor porpoise (*Phocoena phocoena*): a case-control approach », *Environmental Health Perspectives* n°114, p. 704-711, 2006.
- [HAR 12] HARWOOD L.A., SMITH T.G., AULD J.C. « Fall Migration of Ringed Seals (*Phoca hispida*) through the Beaufort and Chukchi Seas, 2001-02 », *Arctic*, n°1, p. 35-44, 2012.
- [HAT 09] HATTORI, R. S., FERNANDINO J. I., KISHII A., KIMURA H., KINNO T., OURA M., SOMOZA G. M., YOKOTA M., STRASSMANN C. A., WATANABE S.. Cortisol-Induced Masculinization: Does Thermal Stress Affect Gonadal Fate in Pejerrey, a Teleost Fish with Temperature-Dependent Sex Determination? *PLoS ONE* 4(8): 65-48, 2009
- [HÉD 09] HÉDOUIN L., BUSTAMANTE P., CHURLAUD C., PRINGAULT O., FICHEZ R., WARNAU M. « Trends in concentrations of selected metalloids and metals in two bivalves from the SW lagoon of New Caledonia », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, n°72(2), p. 372–381, 2009.
- [HOE 03] HOEKSTRA P.F., O'HARA T.M., FISK A.T., BORGA K., SOLOMON K.R., MUIR D.C.G. « Trophic transfer of persistent organochlorine contaminants (OCs) within an Arctic marine food web from the southern Beaufort–Chukchi seas », *Environmental Pollution*, n°124, p. 509–522, 2003.
- [HOH 13] HOHAGEN J., JACKSON D.J. « ancient process in a modern mollusc: early development of the shell in *Lymnaea stagnalis* », *BMC Developmental Biology*, n° 13, p.27 DOI, 10.1186/1471-213X-13-27, 2013.
- [HOH 15] HOHAGEN J., HERLITZE I., JACKSON D.J. « An optimised whole mount *in situ* hybridisation protocol for the mollusc *Lymnaea stagnalis* », *BMC Developmental Biology*, n° 15, p.19. DOI, 10.1186/s12861-015-0068-7, 2015.
- [HOL 94] HOLM, G., LUNDSTRÖM J., ANDERSSON T., NORRGREN L. Influences of halogenated organic substances on ovarian development and hepatic EROD activity in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology* 29(3-4): 241-256, 1994
- [HOL 93] HOLM, G., L. NORRGREN, ANDERSSON T., THUREN A. Effects of exposure to food contaminated with PBDE, PCN or PCB on reproduction, liver morphology and cytochrome P450 activity in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Aquatic Toxicology* 27(1-2): 33-50, 1993.
- [HOM 10] HOMMEN U., BAVECO J., GALIC N., VAN DEN BRINK P.J. « Potential application of ecological models in the European environmental risk assessment of chemicals I: review of protection goals in EU directives and regulations », *Integrated Environmental Assessment and Management*, n° 6, p. 325-337, 2010.
- [HON 86] HONDA K., NASU T., TATSUKAWA R. « Seasonal changes in mercury accumulation in the black-eared kite, *Milvus migrans lineatus* », *Environmental Pollution*, n°42, p. 325-334, 1986.
- [HOW 94] HOWELL W. L., HUNSINGER R. N., BLANCHARD P. D. Paradoxical masculinization of female Western Mosquitofish during exposure to spironolactone. *The Progressive Fish Culturist* 56: 51-55, 1994
- [HUG 71] HUGHES R.N. « Reproduction of *Scrobicularia plana* Da Costa (Pelecypoda: Semelidae) in North Wales ». *Veliger*, n° 14, p. 77–81, 1971.

[HYL 17a] HYLLAND K., ROBINSON C.D., BURGEOT T., MARTÍNEZ-GÓMEZ C., LANG T., SVAVARSON J., THAIN J.E., VETHAAK A.D. «Integrated chemical and biological assessment of contaminant impacts in selected European coastal and offshore marine areas». *Marine Environmental Research*. 124, 130-138, 2017a.

[HYL 17b] HYLLAND K., BURGEOT T., MARTÍNEZ-GÓMEZ C., LANG T., ROBINSON C., SVAVARSON J., THAIN J.E., GUBBINS M.J. «How can we quantify impacts of contaminants on marine ecosystems? The ICON project». *Marine Environmental Research*. 124, 2-10, 2017b.

[ISS 10] ISSARTEL J., BOULO V., WALLON S., GEFFARD O., CHARMANTIER G. « Cellular and molecular osmoregulatory responses to cadmium exposure in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) », *Chemosphere*, n°81, p. 701-710, 2010.

[IVE 04] IVERSON S.J., FIELD C., BOWEN W.D., BLANCHARD W. « Quantitative fatty acid signature analysis: a new method of estimating predator diet », *Ecological Monographs*, n°74, p. 11–235, 2004.

[JAG 12] JAGER T., ZIMMER E.I. « Simplified Dynamic Energy Budget model for analysing ecotoxicity data », *Ecological Modelling*, n° 225, p. 74-81, 2012.

[JAG 13] JAGER T., MARTIN B.T., ZIMMER E.I. « DEBkiss or the quest for the simplest generic model of animal life history », *Journal of Theoretical Biology*, n° 328, p. 9-18, 2013.

[JAG 14] JAGER T., BARSÌ A., HAMDAN T., MARTIN B.T., ZIMMER E.I., DUCROT V. « Dynamic energy budgets in population ecotoxicology: applications and outlook », *Ecological Modelling*, n° 280, p. 140-147, 2014.

[JAQ 08] JAQUEMET S., POTIER M., CHEREL Y., KOJADINOVIC J., BUSTAMANTE P., RICHARD P., CATRY T., RAMOS J.A., LE CORRE M. « Comparative foraging ecology and ecological niche of a superabundant tropical seabird: the sooty tern *Sterna fuscata* in the southwest Indian Ocean », *Marine Biology*, n°155(5), p. 505–520, 2008.

[JAR 06] JARNE P., AULD J.R. « Animals mix it up too: the distribution of self-fertilization among hermaphroditic animals ». *Evolution*, n°60, p. 1816-1824, 2006.

[JOL 12] JOLLY S., BADO-NILLES A., LAMAND F., TURIES C., CHADILI E., PORCHER J. M., BÉTOULLE S., SANCHEZ W. Multi-biomarker approach in wild European bullhead, *Cottus sp.*, exposed to agricultural and urban environmental pressures: practical recommendations for experimental design. *Chemosphere* 87: 675-683, 2012

[JUB 12a] JUBEAUX G., SIMON R., SALVADOR A., QUÉAU H., CHAUMOT A., GEFFARD O. « Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835) : Functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males », *Aquatic Toxicology*, n°112-113, p. 72-82, 2012a.

[JUB 12b] JUBEAUX G., AUDOUARD-COMBE F., SIMON R., TUTUNDJIAN R., SALVADOR A., GEFFARD O., CHAUMOT A. « Vitellogenin-like protein among invertebrate species diversity : potentiel of proteomic mass spectrometry (LC-MS/MS) for biomarker development », *Environmental Science & Technology*, n°46, p 6315-6323, 2012b.

[JUB 12c] JUBEAUX G., SIMON R., SALVADOR A., LOPES C., LACAZE E., QUÉAU H., CHAUMOT A., GEFFARD O. « Vitellogenin-like protein measurement in caged *Gammarus fossarum* males as a biomarker of endocrine disruptor exposure: inconclusive experience », *Aquatic Toxicology*, n°122-123, p. 9-18, 2012c.

[JUM 12] JUMEL A., COUTELLEC M.-A., CRAVEDI J.-P., LAGADIC L. « Nonylphenol polyethoxylate adjuvant mitigates the reproductive toxicity of fomesafen to the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* in outdoor experimental ponds », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n° 21, p. 1876–1888, 2002.

[KAS 09] KASSAHN K.S., DANG V.T., WILKINS S.J., PERKINS A.C., RAGAN M.A. « Evolution of gene function and regulatory control after whole-genome duplication: comparative analyses in vertebrates », *Genome Research*, n° 19, p. 1404-1418, 2009.

[KEI 01] KEITH P., ALLARDI J. *Atlas des poissons d'eau douce de France*, Patrimoines Naturels, 47: 387, 2001.

[KET 08] KETATA I., DENIER X., CHAFFAI A., MINIER C. « Endocrine-related reproductive effects in molluscs », *Comparative Biochemistry and Physiology*, n° 147: p. 261-270, 2008.

[KID 07] KIDD K. A., BLANCHFIELD P. J., MILLS K. H., PALACE V. P., EVANS R. E., LAZORCHAK J. M., FLICK R. W. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(21): 8897-8901, 2007.

[KIN 10] KINANI S., BOUCHONNET S., CREUSOT N., BOURCIER S., BALAGUER P., PORCHER J.-M., AÏT-AÏSSA S.

Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environmental Pollution* 158(1): 74-83.

[KLE 11] KLERKS P.L., XIE L., LEVINTON J.S. « Quantitative genetics approaches to study evolutionary processes in ecotoxicology: a perspective from research on the evolution of resistance », *Ecotoxicology*, n° 20, p. 513-523, 2011.

[KNO 03] KNOTT K.E., PUURTINEN M., KAITALA V. « Primers for nine microsatellite loci in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* », *Molecular Ecology Notes*, n° 3, p. 333-335, 2003.

[KOJ 07] KOJADINOVIC J., BUSTAMANTE P., CHURLAUD C., COSSON R.P., LE CORRE M. « Mercury in seabird feathers: insight on dietary habits and evidence for exposure levels in the Western Indian Ocean », *Science of the Total Environment*, n°384, p. 194–204, 2007.

[KOO 00] KOOIJMAN S.A.L.M. *Dynamic energy and mass budgets in biological systems*, 2nd edn, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2000.

[KRA 11] KRAMER V.J., ETTERTSON M.A., HECKER M. MURPHY C.A., ROESIADI G., SPADE D.J., SPROMBERG J.A., WANG M., ANKLEY G.T. « Adverse outcome pathways and ecological risk assessment: Bridging to population-level effects », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n°30, p. 64-76, 2011.

[KUN 10] Kunz P.Y., Kienle C., Gerhardt A. « *Gammarus* spp. in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: Toward integrated multilevel tests », *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, n°205, p. 1-76, 2010.

[KUP 12] KUPISCH, M., MOENICKES, S., SCHLIEF, J. FRASSL M., RICHTER O. « Temperature-dependent consumer-resource dynamics: A coupled structured model for *Gammarus pulex* (L.) and leaf litter », *Ecological Modelling*, n°247, p. 157-167, 2012.

[LAC 11a] LACAZE E., DEVAUX A., JUBEAUX G., MONS R., GARDETTE M., BONY S., GARRIC J., GEFFARD O. « DNA damage in *Gammarus fossarum* sperm as a biomarker of genotoxic pressure : intrinsic variability and reference level », *Science of the Total Environment*, n°409, p. 3230-3236, 2011a.

[LAC 11b] LACAZE E., DEVAUX A., MONS R., BONY S., GARRIC J., GEFFARD A., GEFFARD O. « DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment », *Environmental Pollution*, n°159, p. 1682-1691, 2011b.

[LAC 11c] LACAZE E., GEFFARD O., GOYET D., BONY S., DEVAUX A. « Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay », *Environmental Research*, n°111, p. 626-634, 2011c.

[LAH 05] LAHAYE V., BUSTAMANTE P., SPITZ J., DAS K., MEYNIER L., MAGNIN V., DABIN W., CAURANT F. « Long-term dietary segregation of common dolphins *Delphinus delphis* in the Bay of Biscay, determined using cadmium as an ecological tracer ». *Marine Ecology Progress Series*, n°305, p. 275–285, 2005.

[LAH 06] LAHAYE V., BUSTAMANTE P., DABIN W., VAN CANNEYT O., DHERMAIN F., CESARINI C., PIERCE G.J., CAURANT F. « New insights from age determination on toxic element accumulation in striped and bottlenose dolphins from the Atlantic and Mediterranean waters », *Marine Pollution Bulletin*, n°52, p. 1219–1230, 2006.

[LAN 07] LANGSTON W.J., BURT G.R., CHESMAN B.S. « Feminisation of male clams *Scrobicularia plana* from estuaries in Southwest UK and its induction by endocrine disrupting chemicals ». *Marine Ecology Progress Series*, n° 333, p. 173-184, 2007.

[LAN 11] LANCE E., ALONZO F., TANGUY M., GÉRARD C., BORMANS M. « Impact of microcystin-producing cyanobacteria on reproductive success of *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata) and predicted consequences at the population level », *Ecotoxicology*, n° 20, p. 719-730, 2011.

[LAN 15] LANGE A., SEBIRE M., ROSTKOWSK, P., MIZUTANI T., MIYAGAWA S., IGUCHI T., HILL E.M., TYLER C.R. « Environmental chemicals active as human antiandrogens do not activate a stickleback androgen receptor but enhance a feminising effect of oestrogen in roach », *Aquatic Toxicology*, n° 168, p. 48-59, 2015.

[LAN 16] LANCE E., DESPRAT J., HOLBECH BF., GÉRARD C., BORMANS M., LAWTON L.A., EDWARDS C., WIEGAND C. « Accumulation and detoxication responses of the gastropod *Lymnaea stagnalis* to single and combined exposures to natural (cyanobacteria) and anthropogenic (the herbicide RoundUp® Flash) stressors », *Aquatic Toxicology*, n° 177, p. 116-124, 2016.

- [LAN 17] LANG T., KRUSE R., HAARICH M., WOSNIOK W. «Mercury species in dab (*Limanda limanda*) from the North Sea, Baltic Sea and Iceland waters in relation to host-specific variables». *Mar. Env. Res.* 124, 32-40, 2017
- [LAW 01] LAWRENCE A.J., POULTER C. «Impact of copper, pentachlorophenol and benzo[a]pyrene on the swimming efficiency and embryogenesis of the amphipod *Chaetogammarus marinus*», *Marine Ecology Progress Series*, n°223, p. 213-223, 2001.
- [LEI 13] LEINONEN T., MCCAIRNS R.S., O'HARA R.B., MERILÄ J. «QST-FST comparisons, p. evolutionary and ecological insights from genomic heterogeneity », *Nature Reviews Genetics*, n° 14, p. 179-190, 2013.
- [LIE 02] LIESS M. « Population response to toxicants is altered by intraspecific interaction », *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, n°, p. 138-142, 2002.
- [LEM 10] LEMOS M.F.L., VAN GESTEL C.A.M., SOARES A.M.V.M. « Reproductive toxicity of the endocrine disrupters vinclozolin and bisphenol A in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Latreille, 1804)», *Chemosphere*, n°78, p. 907-913, 2010
- [LIB 07] LIBER K., GOODFELLOW W., DEN BESTEN P., CLEMENTS W., GALLOWAY T., GERHARDT A., GREEN A., SIMPSON S. « *In situ*-based effects measures: considerations for improving methods and approaches», *Integrated Environmental Assessment and Management*, n°3, p. 246-258, 2007.
- [LOR 10] LOREAU M. *From populations to ecosystems: theoretical foundations for a new ecological synthesis*, Princeton University Press, Princeton, NJ, USA, 2010.
- [LYN 98] LYNCH M., WALSH B. *Genetics and analysis of quantitative traits*, Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA, 1998.
- [MAC 97] MACNEIL C., DIC J.T.A., ELWOO R.W. «The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda): Problems and perspectives concerning the functional feeding group concept», *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, n°72, p. 349-364, 1997.
- [MAL 90] MALTBY L., NAYLOR C. « Preliminary observations on the ecological relevance of the *Gammarus* 'scope for growth' assay: effect of zinc on reproduction», *Functional Ecology*, n°4, p. 393-397, 1990.
- [MAL 94a] MALTBY L. « Stress, shredders and streams: using *Gammarus* energetics to assess water quality. In: Water Quality and Stress Indicators in Marine and Freshwater Ecosystems. Linking levels of organisation (Individuals, Population, Communities)», Ed DW Sutcliffe. Freshwater Biological Association, Ambleside, UK pp 98-110, 1994a.
- [MAL 94b] MALTBY L., CRANE M. « Responses of *Gammarus pulex* (Amphipoda, Crustacea) to metalliferous effluents: Identification of toxic components and the importance of interpopulation variation», *Environmental Pollution*, n°84, p. 45-52, 1994b.
- [MAL 99] MALTBY L. « Studying stress: the importance of organism-level responses», *Ecological Applications*, n°9, 431-440, 1999.
- [MAL 06] MALTBY L., BURTON JR G.A. « Field-based effects measures», *Environmental Toxicology and Chemistry*, n°25, p. 2261-2262, 2006.
- [MAL 02] MALTBY L., CLAYTON S.A., WOOD R.M., MCLOUGHLIN N. « Evaluation of the *Gammarus pulex in situ* feeding assay as a biomonitor of water quality: Robustness, responsiveness, and relevance», *Environmental Toxicology and Chemistry*, n°21, p. 361-368, 2002.
- [MAL 08] MALTBY L., HILLS L. « Spray drift of pesticides and stream macroinvertebrates: Experimental evidence of impacts and effectiveness of mitigation measures», *Environmental Pollution*, n°156, p. 1112-1120, 2008.
- [MAR 12] MARTIN B.T., ZIMMER., E.I., GRIMM V., JAGER T. « Dynamic Energy Budget theory meets individual-based modelling: a generic and accessible implementation », *Methods in Ecology and Evolution*, n° 3, p. 445-449, 2012.
- [MAR 15] MARTÍNEZ-GÓMEZ C., BIGNELL J., LOWE D. «Lysosomal membrane stability in mussels». *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*. 56, pp 46, 2015
- [MAZ 16] MAZZITELLI J.-Y., BONNAFE E., KLOPP C., ESCUDIER F., GERET F. «*De novo* transcriptome

sequencing and analysis of freshwater snail (*Radix balthica*) to discover genes and pathways affected by exposure to oxazepam », *Ecotoxicology*, DOI, p.10.1007/s10646-016-1748-1, 2016.

[MCL 00] MCLOUGHLIN N., YIN D.Q., MALTBY L. WOOD R.M., YU H. « Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers^o », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n°19, p. 2085-2092, 2000.

[MEN *in press*] MENDOZA-PORRAS O., BOTWRIGHT N.A., REVERTER A., COOK M.T., HARRIS J.O., WIJFFELS G., COLGRAVE M.L. « Identification of differentially expressed reproductive and metabolic proteins in the female abalone (*Haliotis laevis*) gonad following artificial induction of spawning », *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, *in press*.

[MIN 15] MINIER C., AMARA R., LEPAGE M. « Fish as reference species in different water masses », In *Aquatic ecotoxicology: Advancing tools for dealing with emerging risks* CRC Press. 2015.

[MOL 84] MOLLE L. « Éloge du Professeur René Truhaut. In: *Revue d'histoire de la pharmacie*, 72^e année n°262 », pp. 340-348, 1984

[MON 96] MONTEIRO L.R., COSTA V., FURNESS R.W., SANTOS R.S. « Mercury concentrations in prey fish indicate enhanced bioaccumulation in mesopelagic environments », *Marine Ecology Progress Series*, n°141, p. 21–25, 1996.

[MOL 84] MOLLE L. « Eloge du Professeur René Truhaut », *Revue d'Hitsoire de la Phharmacie*, n°262, p.340-348, 1984

[MÖS 97] MÖSSNER S., BALLSCHMITER K. « Marine mammals as global pollution indicators for organochlorines », *Chemosphere*, n°34(5-7), p. 1285-1296, 1997.

[MOU 15] MOUGIN C., AZAM D., CAQUET T., CHEVIRON N., DEQUIEDT S., LE GALLIARD J.-F., GUILLAUME O., HOUOT S., LACROIX G., LAFOLIE F., MARON P.-A., MICHNIEWICZ R., PICHOT C., RANJARD L., ROY J., ZELLER B., CLOBERT J., CHANZY A. « A coordinated set of ecosystem research platforms open to international research in ecotoxicology », *Environmental Science and Pollution Research*, n° 22, p. 16215-16228, 2015.

[NAK 14] NAKADERA Y., SWART E.M., HOFFER J.N.A., DEN BOON O., ELLERS J., KOENE J.M. « Receipt of seminal fluid proteins causes reduction of male investment in a simultaneous hermaphrodite », *Current Biology*, n° 24, p. 859-862, 2014.

[NET 85] NETTLESHIP D.N., BIRKHEAD T.R. « The Atlantic Alcidae - The evolution, distribution and biology of the auks inhabiting the Atlantic Ocean and adjacent water areas ». Academic Press, London, 1985.

[NEW 10] NEWSOME S.D., CLEMENTZ M.T., KOCH P.L. « Using stable isotope biogeochemistry to study marine mammal ecology », *Marine Mammal Science*, n°26(3), p. 509-572, 2010.

[NOR 99] NORTHRIDGE S.P., HOFMAN R.J. « Marine mammal interactions with fisheries », *Conservation and management of marine mammals*, p.99-119, 1999.

[NRC 12] NRC 2012. Exposure Science in the 21st Century: A Vision and a Strategy. Washington, DC: National Academy of Sciences.

[NYL 96] NYLANDER W. « Les lichens des environs de Paris », *Librairie des Sciences Naturelles Paul Klincksieck*, 142 p, 1896

[NYM 14] NYMAN A.-M., SCHIRMER K., ASHAUER R. « Importance of toxicokinetics for interspecies variation in sensitivity to chemicals », *Environmental Science and Technology*, n° 48, p. 5946-5954, 2014.

[OCH 02] OCHOA-ACUÑA H., SEPÚLVEDA M.S., GROSS T.S. « Mercury in feathers from Chilean birds: influence of location, feeding strategy, and taxonomic affiliation », *Marine Pollution Bulletin*, n°44, p. 340-345, 2002.

[OTT 14] OTTE K.A., FRÖHLICH T., ARNOLD G.J., LAFORSCH, C. « Proteomic analysis of *Daphnia magna* hints at molecular pathways involved in defensive plastic responses^o », *BMC Genomics*, n°15, p. 306, 2014.

[OSP 16] OSPAR COMMISSION. « Trial application of the OSPAR JAMP integrated Guidelines for the integrated Monitoring and Assessment of Contaminants ». Hazardous substances and Eutrophication Series. Publication Number : 678/2016. 19p, 2016.

- [OZI 17] Oziolor E.M., Bickham J.W., Matson C.W. « Evolutionary toxicology in an omics world », *Evolutionary Applications* n°00, p. 1–10, 2017. DOI: 10.1111/eva.12462
- [PAE 56] PAES-DA-FRANCA M.L. « Variacao sazonal das gonadas em *Scrobicularia plana* da Costa», *Arq Mus Bocage Nov Ser*, n° 27, p. 107–124, 1956.
- [PAR 16] PARUK J.D., ADAMS E.M., UHER-KOCHA H., KOVACH K.A., LONG D., PERKINS C., SCHOCH N., EVERS D.C. « Polycyclic aromatic hydrocarbons in blood related to lower body mass in common loons », *Science of the Total Environment*, n°565, p. 360–368, 2016.
- [PAV 92] PAVLOV D. D., CHUIKO G. M., GERASSIMOV Y. V., TONKOPIY V. D. Feeding behavior and brain acetylcholinesterase activity in bream (*Abramis brama* L.) as affected by DDVP, an organophosphorus insecticide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 103(3): 563-568, 1992.
- [PAY 96] PAYNE J. F., MATHIEU A., MELVIN W., FANCEY L. L. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin* 32(2): 225-231, 1996.
- [PED 09] PEDERSEN S., SELCK H., SALVITO D., FORBES V. « Effects of the polycyclic musk HHCB on individual- and population-level endpoints in *Potamopyrgus antipodarum* », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, n° 72, p. 1190–1199, 2009.
- [PET 17] PETERSON S.H., ACKERMAN J.T., EAGLES-SMITH C.A., HARTMAN C.A., HERZOG, M.P., A critical evaluation of the utility of eggshells for estimating mercury concentrations in avian eggs. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2017. DOI: 10.1002/etc.3777
- [PIE 08] PIERCE G.J., SANTOS M.B., MURPHY S., LEARMONTH J.A., ZUUR A.F., ROGAN E., BUSTAMANTE P., CAURANT F., LAHAYE V., RIDOUX V., ZEGERS B.N., METS A., ADDINK M., SMEENK C., JAUNIAUX T., LAW R.J., DABIN W., LÓPEZ A., ALONSO FARRÉ J.M., GONZÁLEZ A.F., GUERRA A., GARCÍA-HARTMANN M., REID R., MOFFAT C.F., LOCKYER C., BOON J.P. « Bioaccumulation of persistent organic pollutants in female common dolphins (*Delphinus delphis*) and harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from western European seas: geographical trends, causal factors and effects on reproduction and mortality », *Environmental Pollution*, n°153, p. 401–415, 2008.
- [PLA 13] PLAUTZ S.C., SALICE C.J. « Plasticity in offspring contaminant tolerance traits: developmental cadmium exposure trumps parental effects », *Ecotoxicology*, n° 22, p. 847–853, 2013.
- [PNR 13] PNRPE. Boulangé-Lecomte C, Chaumot A, Fonbonne C, Forget-Leray J, Geffard O, Jubeaux G, Quéau H, Salvador A, Simon R, Xuereb B. « La vitellogénine comme biomarqueur d'exposition et d'effet aux perturbateurs endocriniens chez *Gammarus fossarum* et *Eurytemora affinis* : développement et application *in situ* », Rapport final, projet PNRPE, pp. 33, 2013.
- [PÖC 90] PÖCKL M., TIMIXCHIL W. « Comparative study of mathematical models for the relationship between water temperature and brood development time of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda) », *Freshwater Biology*, n°23, p. 433-440, 1990.
- [POI 11] POISSON E., AMIARD-TRIQUET C., BUDZINSKI H., BURGEOT T., COUTEAU J., DURAND G., DURAND F., FISSON C., FORGET-LERAY J., LETENNDRE J., SOUSSI S., XUERE B. Les effets de la contamination chimiques sur les organismes vivants en estuaire de Seine. Fascicule Seine Aval 2 .68p , 2011.
- [POP 15] POPE N.D., CHILDS K., DANG C., DAVEY M.S., O'HARA S.C.M., LANGSTON K., MINIER C., PASCOE P.L., SHORTRIDGE E., [LAN 15] LANGSTON W.J. « Intersex in the clam *Scrobicularia plana* (Da Costa): Widespread occurrence in English Channel estuaries and surrounding areas », *Marine Pollution Bulletin*, n°95, p. 598-609, 2015.
- [REG 02] REGOLI F., GORBI S., FRENZILLI G., NIGRO M., CORSI I., FOCARDI S., WINSTON G.W. « Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach », *Marine Environmental Research*, n° 54, p. 419–423, 2002.
- [RIG 10] RIGÉT F., BIGNERT A., BRAUNE B., STOW J., WILSON S. « Temporal trends of legacy POPs in Arctic biota, an update », *Science of the Total Environment*, n°408(15), p. 2874-2884, 2010.

- [RIV 97] RIVIERE J.L. «Ecotoxicologie: Théorie et applications» traduit par Jean Louis Rivière de FORBES V.E & FORBES T.L, 1994. Ecotoxicology in theory and practice. Chapman & Hall, Londres, Royaume Uni. 256, 1997.
- [RIS 76] RISEBROUGH R.W., WALKER II W., SCHMIDT T.T., DE LAPPE B.W., CONNORS C.W. « Transfer of chlorinated biphenyls to Antarctica », *Nature*, n°264(5588), p. 738-739, 1976.
- [RIT 97] RITTERHOFF J., ZAUKE G.-P. « Influence of body length, life-history status and sex on trace metal concentrations in selected zooplankton collectives from the Greenland Sea. *Marine Pollution Bulletin*, n° 34, p. 614-621, 1997.
- [ROD 03] RODRÍGUEZ-RÚA A., PRADO M.A., ROMERO Z., BRUZÓN M. « The gametogenic cycle of *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778) (Mollusc: Bivalve) in Guadalquivir estuary (Cádiz, SW Spain) ». *Aquaculture*, n° 217, p. 157-166, 2003.
- [ROS 00] ROSS P.S., ELLIS G.M., IKONOMOU M.G., BARRETT-LENNARD L.G., ADDISON R.F. « High PCB concentrations in free-ranging Pacific killer whales, *Orcinus orca*: effects of age sex and dietary preference », *Marine Pollution Bulletin*, n°40, p. 504-515, 2000.
- [ROY 09] ROY A., LIN Y. N., AGNO J. E., DEMAYO F.J., MATZUK M.M. « Tektin3 is required for progressive sperm motility in mice », *Molecular Reproduction and Development*, n° 76, p. 453-459, 2009.
- [RUI 93] RUIZ J.M. « Metallic pollution in estuaries, with special reference to the effects of tributyltin (TBT) and copper on the early life stages of *Scrobicularia plana* (Mollusca: Bivalvia) ». PhD dissertation, University of Plymouth, 1993.
- [RUS 04] RUSSO J., LAGADIC L. « Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda., Pulmonata) », *Environmental Pollution*, n° 127, p. 303-311, 2004.
- [RUS 07a] RUSSO J., LEFEUVRE-ORFILA L., LAGADIC L. « Hemocyte-specific responses to the peroxidizing herbicide fomesafen in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata) », *Environmental Pollution*, n° 146, p. 420-427, 2007a.
- [RUS 07b] RUSSO J., MADEC L. 2007 « Haemocyte apoptosis as a general cellular immune response of the snail *Lymnaea stagnalis* to a toxicant », *Cell Tissue Research*, n° 328, p. 431-441, 2007b.
- [RUS 08] RUSSO J., MADEC L., BREHELIN M. «Effect of a toxicant on phagocytosis pathways in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* », *Cell Tissue Research*, n° 333, p. 147-158, 2008.
- [SAD 12] SADAMOTO H., TAKAHASHI H., OKADA T., KENMOKU H., TOYOTA M., ASAKAWA, Y.« *De novo* sequencing and transcriptome analysis of the central nervous system of mollusc *Lymnaea stagnalis* by deep RNA sequencing» *PLoS ONE*, n° 7(8), e42546, 2012.
- [SAL 16] SALEUDDIN A.S.M., MUKAI T.S. *Physiology of molluscs: a collection of selected reviews*, Apple Academic Press, CRC Press, Waretown, USA, 2016.
- [SAL 03] SALICE C.J., MILLER T.J. « Population-level responses to long-term cadmium exposure in two strains of the freshwater gastropod *Biomphalaria glabrata*: Results from a life-table response experiment », *Environmental Toxicology and Chemistry*, n° 22, p. 678-688, 2003.
- [SAN 09] SANCHEZ W., PORCHER J.M. « Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, n°28, p. 150-158, 2009.
- [SAN 10] SANCHEZ W., PICCINI B., MAILLOT-MARÉCHAL E., PORCHER J. M. Comparison of two reference systems for biomarker data analysis in a freshwater biomonitoring context. *Environment International* 36: 377-382, 2010.
- [SAN 11] Sanchez W., Sremski W., Piccini B., Palluel O., Maillot-Maréchal E., Betoulle S., Jaffal A., Aït-Aïssa S. I., Brion F., Thybaud E., Hinfray N., Porcher J.-M. Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environment International* 37(8): 1342-1348, 2011.
- [SAN 12] SANCHEZ W., BURGEOT T., PERCEVAL O. Perspectives from the French workshop on the development and validation of biomarkers and bioassays for the monitoring of aquatic environments. *Environmental Science*

and *Pollution Research*: 65-71. 2012.

[SAR 04] SARMENTO A., GUILHERMINO L., AFONSO A. Mercury chloride effects on the function and cellular integrity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head kidney macrophages. *Fish & Shellfish Immunology* 17: 489-498, 2004.

[SAV 13] SAVERY L.C., EVERS D.C., WISE S.S., FALANK C., WISE J., GIANIOS C., KERR I., PAYNE R., THOMPSON W.D., PERKINS C., ZHENG T., ZHU C., BENEDICT L., WISE J.P. « Global mercury and selenium concentrations in skin from free-ranging sperm whales (*Physeter macrocephalus*) », *Science of the Total Environment*, n°450-451, p. 59-71, 2013.

[SAV 14] SAVERY L.C., WISE S.S., FALANK C., WISE J., GIANIOS C., THOMPSON W.D., PERKINS C., ZHENG T., ZHU C., WISE J.P. « Global assessment of oceanic lead pollution using sperm whales (*Physeter macrocephalus*) as an indicator species », *Marine Pollution Bulletin*, n°79(1-2), p. 236-244, 2014.

[SAV 15] SAVERY L.C., CHEN T.L., WISE J.T.F., WISE S.S., GIANIOS C., BUONAGURIO J., PERKINS C., FALANK C., ZHENG T., ZHU C., WISE J.P. SR. « Global assessment of cadmium concentrations in the skin of free-ranging sperm whales (*Physeter macrocephalus*) », *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, n°178, p. 136-144, 2015.

[SCH 08] SCHEIL V., TRIEBSKORN R., KOHLER H.R. « Cellular and stress protein responses to the UV filter 3-benzylidene camphor in the amphipod crustacean *Gammarus fossarum* (Koch 1835)°», *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, n°54, p. 684-9, 2008.

[SCH 06] SCHIRLING M., JUNGSMANN D., LADEWIG V., LUDWICHOWSKI K.-U., NAGEL R., KÖHLER H.-R., TRIEBSKORN R. « Bisphenol A in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda)°», *Ecotoxicology*, n°15, p. 143-56, 2006.

[SCH 05] SCHIRLING M., JUNGSMANN D., LADEWIG V., NAGEL R., TRIEBSKORN R., KÖHLER H.-R. « Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): Influence of Wastewater Effluents, Temporal Variability, and Spatial Aspects on Natural Populations°», *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, n°49, p.53-61, 2005.

[SEB 16] SEBASTIANO M., BUSTAMANTE P., COSTANTINI D., EULAERS I., MALARVANNAN G., MÈNDEZ-FERNANDEZ P., CHURLAUD C., BLÉVIN P., HAUSELMANN A., DELL'OMO G., COVACI A., EENS M., CHASTEL O. « High levels of mercury and low levels of persistent organic pollutants in a tropical seabird in French Guiana, the Magnificent frigatebird, *Fregata magnificens* », *Environmental Pollution*, n°214C, p. 384-393, 2016.

[SEB 16] SEBASTIANO M., BUSTAMANTE P., EULAERS I., MALARVANNAN G., MENDEZ-FERNANDEZ P., CHURLAUD C., BLÉVIN P., HAUSELMANN A., COVACI A., EENS M., COSTANTINI D., CHASTEL O. « Trophic ecology drives contaminant concentrations within a tropical seabird community », *Environmental Pollution*, n°227C, p. 183-193, 2017.

[SHO 14] SHORT S., YANG G., KILLE P., FORD A.T. « Vitellogenin is not an appropriate biomarker of feminisation in a crustacean°», *Aquatic Toxicology*, n°153, p. 89-97, 2014.

[SIA 07] SIAH, A., MASSON R., LOUP B., BULTELE F. PELLERIN J., LÉBOULENGER F. DANGER J. M. « Receptor activated protein kinase is down-regulated in the male gonad of the marine bivalve mollusc *Mya arenaria* exposed to tributyltin », *Aquatic Toxicology*, n° 83, p. 295–305, 2007.

[SOT 04] SOTO A.M., CALABRO J. M., PRECHTL N. V., YAU A. Y., ORLANDO E. F., DAXENBERGER A., KOLOK A. S., GUILLETTE L. J., LE BIZEC B., LANGE I. G., SONNENSCHNEIN C. Androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving Cattle Feedlot effluent in Eastern Nebraska, USA. *Environmental Health Perspectives* 112(3): 346-352, 2004.

[SOL 16] SOLHEIM S.A., SAGERUP K., HUBER S., BYRKJEDAL I., GABRIELSEN G.W. « The black-legged kittiwake preen gland - an overlooked organ for depuration of fat-soluble contaminants? », *Polar Research*, n°35, p. 29651, 2016.

[SQU 83] SQUIRES D.F. «The Ocean Dumping Quandary: Waste Disposal in the New York Bight», State University of New York press, Albany, NY. 1983

[STE 92] STEBBING A.R.D, DETHLEFSEN V., ADDISON R.F., CARR M., CHAPMAN P.M., COFINO W., HEIP C.H.R., KARBE I., MOORE M.N., VETHAAK A.D. «Overall summary and some conclusions from the Bremerhaven workshop». *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91, 1-8, 1992.

[STU 92] STUHLBACHER A., MALTBY L. « Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L)^o », *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, n°22, p. 319-324, 1992.

[SUM 95] SUMPTER, J. P., JOBLING S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives* 103: 173-178, 1995.

[SUN 98] SUNDELIN B., ERIKSSON A.K. « Malformations in embryos of the deposit-feeding amphipod *Monoporeia affinis* in the Baltic Sea^o », *Marine Ecology Progress*, n°171, p. 165-180, 1998.

[TRA 14a] TRAPP J., GEFFARD O., IMBERT G., GAILLARD J.-C., DAVIN A.H., CHAUMOT A., ARMENGAUD J. « Proteogenomics of *Gammarus fossarum* to document the reproductive system of amphipods », *Molecular and Cellular Proteomics*, n° 13, p. 3612-3625, 2014a.

[TRA 14b] TRAPP J., ARMENGAUD J., SALVADOR A., CHAUMOT A., GEFFARD O. « Next-Generation Proteomics: Toward Customized Biomarkers for Environmental Biomonitoring^o », *Environmental Science and Technology*, n°48, p. 13560-13572, 2014b.

[TRA 14c] TRAPP J.; GEFFARD O., IMBERT G., GAILLARD J., DAVIN A.H., CHAUMOT A., ARMENGAUD J. « Proteogenomics of *Gammarus fossarum* to document the reproductive system from amphipods^o », *Molecular and Cellular Proteomics*, n°13, p. 3612-3625, 2014c.

[TRA 14d] TRAPP J., ARMENGAUD J., PIBLE O., GAILLARD J.-C., ABBACI K., HABTOUL Y., CHAUMOT A., GEFFARD O. « Proteomic investigation of male *Gammarus fossarum*, a freshwater crustacean, in response to endocrine disruptors^o », *Journal of Proteome Research*, n°14, p. 292-303, 2014d.

[TRU 77] TRUHAUT R. « Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives ». *Ecotoxicol. Env. Safety*. 1, 151-73, 1977

[TUB 02] TUBERTY SR., NATES SF., MCKENNEY JR. CL. « Polyclonal antisera against estuarine crustacean vitellins: a molecular approach to reproductive endocrinology and toxicology^o », In: Escobar-Briones, E., Alvarez, F. (Eds.), *Modern Approaches to the Study of Crustacea*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, pp. 29-37, 2002

[TUF 15] TUFI S., STEL J.M., DE BOER J., LAMOREE M.H., LEONARDS P.E. « Metabolomics to explore imidacloprid-induced toxicity in the central nervous system of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* », *Environmental Science and Technology*, n° 49, p. 14529-14536, 2015.

[TUR 14] Turja R., Guimarães L., Nevala A., Kankaanpää H., Korpinen S., Lehtonen K.K. « Cumulative effects of exposure to cyanobacteria bloom extracts and benzo[a]pyrene on antioxidant defence biomarkers in *Gammarus oceanicus* (Crustacea: Amphipoda)^o », *Toxicon*, n°78, p. 68-77, 2014.

[UNE 99] UNEP/RMOGE. Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring programme, UNEP, Athens, pp, 1-92, 1999.

[VÄI 08] VÄINÖLÄ R., WITT J.D.S., GRABOWSKI M., BRADBURY J.H., JAZDZEWSKI K., SKET B. « Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater^o » *Hydrobiologia*, n°595, p. 241-225, 2008.

[VAL 06] VALAVANIDIS A., VLAHOGIANNI T., DASSENAKIS M., SCULLOS M. « Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, n° 64, p. 178-189, 2006.

[VAN 03] VAN DER OOST, R., BEYERB J., VERMEULEN N. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13(2): 57-149, 2003.

[VAN 14] VANDEGEHUCHTE M.B., JANSSEN C.R. « Epigenetics in an ecotoxicological context », *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, n° 764-765, p. 36-45, 2014.

[VEE 92] VEERASINGHAM M., CRANE M. « Impact of farm waste on freshwater invertebrate abundance and the feeding rate of *Gammarus pulex* L^o », *Chemosphere*, n°25, p. 869-874, 1992

[VER 06] VERREAUULT J., VILLA R.A., GABRIELSEN G.W., SKAARE J.U., LETCHER R.J. « Maternal transfer of organohalogen contaminants and metabolites to eggs of Arctic-breeding glaucous gulls », *Environmental Pollution*, n°144, p. 1053-1060, 2006.

- [VET 17] VETHAAK A.D, DAVIES L.M., THAIN J., GUBBINS M.J., MARTÍNEZ-GÓMEZ C., ROBINSON C., MOFFAT C.F., BURGEOT T., MAES T., WOSNIOK W., GILTRAP M., LANG T., HYLLAND K. «Integrated indicator framework and methodology for monitoring and assessment of hazardous substances and their effects in the marine environment». *Mar. Env. Res.* 11-20, 2017
- [VIE 09] VIEIRA, L. R., GRAVATO C., SOARES A. M. V. M., MORGADO F., GUILHERMINO L. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere* 76(10): 1416-1427, 2009.
- [VOL 04] VOLZ DC, CHANDLER GT. « An enzyme-linked immunosorbent assay for lipovitellin quantification in copepods: A screening tool for endocrine toxicity^o», *Environmental Toxicology and Chemistry*, n°23: p. 298-305, 2004.
- [VON 04] VON DER OHE P.C., LIESS M. « Renlative sensitivity distribuon of aquatic invertebrates to organic and metal compounds^o» *Environmental Toxicology and Chemistry*, n°23, p. 150 – 156, 2004.
- [WEL 06] WELLS D.E., DE BOER J. «Evaluation of the quality of measurement of organochlorine contaminants in the marine environment the QUASIMEME experience». *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 351363, 2006.
- [WHI 00] WHITLOCK M.C., INGVARSSON P.K., HATFIELD T. « Local drift load and the heterosis of interconnected populations», *Heredity*, n° 84, p. 452-457, 2000.
- [WHY 00] Whyte, J. J., Jung R. E., Schmitt C. J., Tillitt D. E. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology*. 30(4): 347-570, 2000.
- [WIL 64] WILBUR K.M., YONGE C.M. *Physiology of Mollusca*, 2nd edn, Academic Press Inc. NY, USA, 1964.
- [WIL 06] WILDING J., MALTBY L. « Relative toxicological importance of aqueous and dietary metal exposure to a freshwater crustacean: Implications for risk assessment^o», *Environmental Toxicology and Chemistry*, n°25, p. 1795-1801, 2006.
- [XUE 07] XUERE B., NOURY P., FELTEN V., GARRIC J., GEFFARD O. « Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos^o», *Toxicology*,
- [XUE 09A] XUERE B., CHAUMOT A., MONS R., GARRIC J., GEFFARD O. « Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys^o», *Aquatic Toxicology*, n°236, p. 178-189, 2007.
- [XUE 09B] XUERE B., LEFÈVRE E., GARRIC J., GEFFARD O. « Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration^o», *Aquatic Toxicology*, n°94, p. 114-122, 2009b.
- [XUE 11] XUERE B., BEZIN L., CHAUMOT A., BUDZINSKI H., AUGAGNEUR S., TUTUNDJIAN R., GARRIC J., GEFFARD O. « Vitellogenin-like gene expression in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization in females and potential for use of use as an endocrine disruption biomarker in males^o», *Ecotoxicology*, n°20, p. 1286-1299, 2011.
- [ZIM 12] ZIMMER E.I., JAGER T., DUCROT V., LAGADIC L., KOOIJMAN S.A.L.M. « Juvenile food limitation in standardized tests – a warning to ecotoxicologists », *Ecotoxicology*, n° 21, p. 2195-2204, 2012.
- [ZIM 14] ZIMMER E.I., DUCROT V., JAGER T., KOENE J., LAGADIC L., KOOIJMAN S.A.L.M. « Metabolic acceleration in the pond snail *Lymnaea stagnalis*? », *Journal of Sea Research*, n° 94, p. 84-91, 2014.

Glossaire

Bio-logging ou biologging : Technique consistant à recueillir des données grâce aux animaux équipés de capteurs

Fitness : Etat physiologique d'un organisme apparaissant physiquement en bonne forme

Hétérosis : L'effet d'hétérosis désigne l'accroissement particulièrement de la performance des individus hybrides